



TECHNISCHE  
UNIVERSITÄT  
DARMSTADT

# **Transkriptionelle Regulation des microRNA Clusters 144-451 während der Hämatopoese sowie Leukämogenese**

**vom Fachbereich Biologie  
der Technischen Universität Darmstadt**

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

**Dissertation von  
Dipl.-Biochem. Nicole Sahner**


Erstgutachterin: Prof. Dr. Beatrix Süß

Zweitgutachter: Prof. Dr. Jörn Lausen

Darmstadt 2019

---

Sahner, Nicole: Transkriptionelle Regulation des microRNA Clusters 144-451  
während der Hämatopoese sowie Leukämogenese  
Darmstadt, Technische Universität Darmstadt  
Veröffentlichungsjahr der Dissertation auf TUpriints: 2019  
URN:  
Tag der mündlichen Prüfung:  
Veröffentlicht unter CC BY-SA 4.0 International  
<https://creativecommons.org/licenses/>



*„Die Wissenschaft fängt eigentlich erst da an interessant zu werden, wo sie aufhört.“*

Justus von Liebig



**Teile dieser Dissertation wurden bereits veröffentlicht in:**

**Kohrs N**, Kolodziej S, Kuvardina ON, Herglotz J, Yillah J, Herkt S, Piechatzek A, Salinas Riester G, Lingner T, Wichmann C, Bonig H, Seifried E, Platzbecker U, Medyouf H, Grez M, Lausen J. „MiR144/451 Expression Is Repressed by RUNX1 During Megakaryopoiesis and Disturbed by RUNX1/ETO.“ PLoS Genet., 2016. 12(3):e1005946. doi: 10.1371/journal.pgen.1005946

---

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	V
Abbildungsverzeichnis .....	VIII
Tabellenverzeichnis .....	XI
1. Zusammenfassung .....	1
2. Einleitung .....	4
2.1. Hämatopoese .....	4
2.1.1. Erythropoese .....	5
2.1.2. Oberflächenmarker .....	6
2.1.3. Regulation der Hämatopoese durch Zytokine .....	7
2.1.4. Regulation der Hämatopoese durch Transkriptionsfaktoren .....	8
2.1.4.1. Der Transkriptionsfaktor Tal1 .....	9
2.1.4.2. Der Transkriptionsfaktor GATA1 .....	10
2.1.4.3. Der Transkriptionsfaktor RUNX1 .....	11
2.2. Epigenetik .....	12
2.2.1. Chromatinstruktur .....	13
2.2.2. Histonmodifikationen .....	14
2.3. Akute myeloische Leukämie (AML) .....	15
2.3.1. Das leukämische Fusionsprotein RUNX1-ETO .....	17
2.3.2. Domänenstruktur von RUNX1-ETO .....	18
2.3.3. Interaktionspartner von RUNX1-ETO .....	19
2.3.4. RUNX1-ETO im Tiermodell .....	20
2.3.5. Zielgene von RUNX1-ETO .....	21
2.4. microRNAs .....	22
2.4.1. Biogenese und Wirkmechanismus der microRNAs .....	22
2.4.2. microRNAs in der Hämatopoese .....	24
2.4.3. microRNAs in malignen Erkrankungen .....	25
2.4.4. microRNA Cluster miR-144/451 .....	26
3. Material und Methoden .....	28
3.1. Chemikalien und Geräte .....	28
3.2. Antikörper .....	28
3.3. Molekularbiologische Methoden .....	29
3.3.1. Standardmethoden .....	29
3.3.2. Vektoren .....	30
3.3.2.1. Expressionsvektor – pcDNA3.1-Flag .....	30
3.3.2.2. Lentiviraler Vektor pLeGO-iG2 .....	30

3.3.2.3.	Lentiviraler Vektor pLeGO-G2 .....	31
3.3.2.4.	Lentiviraler Vektor pSIEW .....	32
3.3.2.5.	Lentiviraler <i>Knockdown</i> -Vektor pSEW .....	32
3.3.2.6.	Lentiviraler <i>Knockdown</i> -Vektor pGIPZ .....	32
3.3.2.7.	Luciferase-Vektor pGL4.10 .....	33
3.3.2.8.	Luciferase-Vektor pGL4.23 .....	33
3.3.3.	Quantitative <i>real time</i> – PCR (qRT-PCR).....	34
3.3.4.	miRNA-Sequenzierung.....	38
3.3.5.	Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP).....	39
3.3.6.	Gesamtzellextrakten.....	40
3.3.7.	Luciferase Assay .....	40
3.4.	Zellbiologische Methoden.....	41
3.4.1.	Zelllinien .....	41
3.4.2.	Kultivierung humaner Zelllinien .....	42
3.4.3.	Einfrieren und Auftauen humaner Zelllinien .....	42
3.4.4.	Differenzierung humaner Zelllinien in Richtung Erythrozyten und Megakaryozyten .....	42
3.4.5.	Isolierung humaner hämatopoetischer Stammzellen aus peripherem Blut.....	42
3.4.6.	Kultivierung primärer humaner hämatopoetischer Stammzellen .....	43
3.4.7.	Differenzierung humaner CD34+ Zellen zu Erythrozyten und Megakaryozyten.....	43
3.4.8.	Koloniebildende Wachstumsversuche mit dem humanen <i>Colony Formation Units</i> – Assay (CFU – Assay).....	44
3.4.9.	Herstellung lentiviraler Partikel.....	44
3.4.10.	Ultrazentrifugation lentiviraler Partikel.....	45
3.4.11.	Transduktion humaner hämatopoetischer Zellen.....	45
3.4.12.	Transiente Transfektion humaner Zelllinien .....	46
3.4.13.	FACS-Analyse (fluorescence activated cell sorting) .....	46
4.	Zielsetzung .....	47
5.	Ergebnisse.....	49
5.1.	miR-451 während der Hämatopoese .....	49
5.1.1.	Identifikation von miRNAs, die während der erythroiden-megakaryozytären Differenzierung von Bedeutung sind.....	49
5.1.2.	Expression der miRNAs miR-144 und miR-451 während der erythroiden bzw. megakaryozytären Differenzierung .....	52
5.1.3.	miR-451 induziert erythroide Differenzierung in hCD34+ Zellen.....	56
5.1.4.	Regulation der Expression des miR-144/451 Clusters durch hämatopoetische Transkriptionsfaktoren.....	58
5.1.5.	Regulation der Promotor- bzw. Enhanceraktivität des miR-144/451 Clusters durch hämatopoetische Transkriptionsfaktoren .....	63
5.1.6.	GATA1, Tal1 und RUNX1 binden im Promotor- bzw. Enhancerbereich des miR-144/451 Lokus .....	65
5.1.7.	Okkupation des miR-144/451 Lokus während der Differenzierung .....	67

5.2.	miR-451 in RUNX1-ETO exprimierenden Zellen .....	69
5.2.1.	RUNX1-ETO reprimiert die erythroide Differenzierung .....	69
5.2.2.	RUNX1-ETO reprimiert die Expression der miR-451 .....	74
5.2.3.	RUNX1-ETO reprimiert die Promotor- und Enhanceraktivität des miR-144/451 Clusters ....	78
5.2.4.	RUNX1-ETO (tr) okkupiert die Promotorregion des miR-144/451 Lokus .....	79
5.2.5.	RUNX1-ETOtr Bindung an den Promotorbereich des miR-144/451 Lokus beeinflusst dessen Epigenetik .....	80
6.	Diskussion .....	83
6.1.	miR-451 während der Hämatopoese .....	83
6.1.1.	miR-451 induziert die erythroide Differenzierung in hCD34+ Zellen .....	83
6.1.2.	Regulation des miR-144/451 Clusters durch hämatopoetische Transkriptionsfaktoren .....	85
6.1.3.	Regulation der Promotor- bzw. Enhanceraktivität des miR-144/451 Clusters durch hämatopoetische Transkriptionsfaktoren .....	86
6.2.	miR-451 in RUNX1-ETO exprimierenden Zellen .....	88
6.2.1.	RUNX1-ETO reprimiert die miR-451 Expression .....	88
6.2.2.	RUNX1-ETO okkupiert die Promotorregion des miR-144/451 Lokus .....	90
7.	Anhang .....	93
7.1.	Ergebnisse der miRNA-Sequenzierung <i>RUNX1</i> überexprimierender K562 Zellen .....	93
7.2.	Danksagung .....	103
7.3.	Veröffentlichungen .....	104
7.3.1.	Publikationen .....	104
7.3.2.	Posterpräsentationen .....	105
7.4.	Lebenslauf .....	106
7.5.	Ehrenwörtliche Erklärung .....	107
	Abkürzungsverzeichnis .....	XIII
	Literaturverzeichnis .....	XVI

---

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Reifestadien während der terminalen Erythropoese.....	6
Abbildung 2: Schematische Darstellung der wichtigsten Differenzierungsstadien während der Hämatopoese. ....	8
Abbildung 3: Regulation der Erythropoese und Megakaryopoese durch Transkriptionsfaktoren.....	9
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Chromatinstruktur. ....	13
Abbildung 5: Analyse der Chromosomen eines männlichen AML-Patienten mit der Translokation t(8;21)(q22;q22).....	18
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von RUNX1-ETO und dessen Interaktionspartnern. ....	19
Abbildung 7: Synthese der microRNAs.....	23
Abbildung 8: Darstellung des Lokus des miR-144/451 Clusters im University of California Santa Cruz Genome (UCSC) Browser. Gelb hinterlegt ist der Bereich der reifen miRNA-144 bzw. miR-451. Diese Sequenz ist hoch konserviert in Wirbeltieren. ....	26
Abbildung 9: Schematische Darstellung der Anzahl differentiell exprimierter miRNAs bei der miRNA-Sequenzierung in RUNX1 überexprimierenden K562 Zellen.....	49
Abbildung 10: Schematische Darstellung der miRNAs, die an der erythroiden-megakaryozytären Differenzierung beteiligt sind. ....	51
Abbildung 11: Validierung der miRNA-Sequenzierung. ....	52
Abbildung 12: miR-144/451 Expression in verschiedenen Zelllinien. ....	53
Abbildung 13: Veränderung der Glykophorin A und CD71 Expression nach Induktion erythroider Differenzierung in den Zelllinien K562 und TF-1 bzw. humanen CD34+ Zellen. ....	54
Abbildung 14: Veränderung der CD41 und Glykophorin A Expression nach Induktion megakaryozytärer Differenzierung in K562 und hCD34+ Zellen. ....	54
Abbildung 15: Veränderung der Exposition der Oberflächenmarker Glykophorin A (CD235a), CD71 und CD41 nach Induktion erythroider bzw. megakaryozytärer Differenzierung in hCD34+ Zellen. ....	55
Abbildung 16: Veränderung der miR-144/451 Expression nach Induktion megakaryozytärer bzw. erythroider Differenzierung in K562, TF-1 und hCD34+ Zellen.....	56
Abbildung 17: Nachweis der Überexpression des Wildtyp- bzw. mutierten miR-144/451 Clusters in lentiviral transduzierten K562 Zellen. ....	57
Abbildung 18: Schematische Darstellung der Durchführung des koloniebildenden Wachstumsexperiments (CFU-Assay).....	58
Abbildung 19: miR-451 und Tal1 erhöhen die Anzahl an erythroiden Kolonien im CFU-Assay mit transduzierten hCD34+ Zellen. ....	58
Abbildung 20: Überexpression von RUNX1 reprimiert die Expression des miR-144/451 Clusters sowie von Glykophorin A in K562 Zellen. ....	59
Abbildung 21: Überexpression von Tal1 und GATA1 erhöht die Expression des miR-144/451 Clusters und von Glykophorin A in K562 Zellen. ....	60
Abbildung 22: <i>Knockdown</i> von RUNX1 erhöht die Expression des miR-144/451 Clusters in K562 Zellen. ....	61
Abbildung 23: <i>Knockdown</i> von Tal1 und GATA1 reprimiert die Expression des miR-144/451 Clusters sowie die Expression der erythroiden Gene <i>GYP A</i> und <i>CD71</i> in K562 Zellen. ....	62
Abbildung 24: <i>Knockdown</i> von RUNX1 erhöht die Expression der miR-451, während der <i>Knockdown</i> von Tal1 und GATA1 die Expression der miR-451 reprimiert in K562 Zellen.....	62



Abbildung 25: Messung der Eigenaktivität des Promotor- und Enhancerbereiches des miR-144/451 Lokus in HEK293T und K562 Zellen. ....	63
Abbildung 26: Schematische Darstellung des humanen miR-144/451 Lokus. ....	64
Abbildung 27: GATA1 und Tal1/E47 wirken aktivierend auf den miR-144/451 Promotor- und Enhancerbereich, während RUNX1 die Aktivität reprimierte in K562 Zellen. ....	64
Abbildung 28: <i>Knockdown</i> von GATA1 und Tal1 in K562 Zellen wirkt reprimierend auf die miR-144/451 Promotor- und Enhanceraktivität. ....	65
Abbildung 29: GATA1 und Tal1 binden bevorzugt in der Enhancerregion, während RUNX1 verstärkt im Promotorbereich bindet in undifferenzierten hCD34+ Zellen. ....	66
Abbildung 30: Tal1 bindet an den Promotorbereich von Glykophorin A, während RUNX1 im Promotorbereich von CD41 bindet in hCD34+ Zellen. ....	67
Abbildung 31: GATA1 und Tal1 Bindung steigt nach erythroider Differenzierung, während die Anreicherung von RUNX1 nach megakaryozytärer Differenzierung von hCD34+ Zellen zunimmt. ....	68
Abbildung 32: Die Anwesenheit von H3K4me3 und H3K9Ac nimmt stark zu nach erythroider Differenzierung von hCD34+ Zellen. ....	69
Abbildung 33: Kontrolle der Überexpression von RUNX1-ETO und RUNX1-ETOr in HEK293T Zellen mittels Westernblot. ....	70
Abbildung 34: RUNX1-ETO (RE) und RUNX1-ETOr (REtr) reprimieren die Expression der erythroiden Gene $\alpha$ -Globin, KLF1, GYPA sowie CD71 in K562 Zellen. ....	71
Abbildung 35: Überexpression von RUNX1-ETO (RE) und RUNX1-ETOr (REtr) in TF-1 Zellen reprimiert die Expression von Glykophorin A sowie von CD71. ....	72
Abbildung 36: Überexpression von RUNX1-ETO (RE) und RUNX1-ETOr (REtr) in hCD34+ Zellen reprimiert die Expression von Glykophorin A sowie von KLF1 und die Ausprägung erythroider Kolonien im CFU-Assay. ....	73
Abbildung 37: RUNX1-ETO (RE) und RUNX1-ETOr (REtr) binden an die Promotorbereiche von Glykophorin A und KLF1 in K562 und hCD34+ Zellen im ChIP-Assay. ....	74
Abbildung 38: Überexpression von RUNX1-ETO (RE) und RUNX1-ETOr (REtr) in K562, TF-1 und hCD34+ Zellen reprimiert die Expression des miR-144/451 Clusters. ....	75
Abbildung 39: <i>Knockdown</i> von RUNX1-ETOr in RUNX1-ETOr überexprimierenden K562 Zellen erhöht die Expression von CD71 sowie des Clusters miR-144/451. ....	75
Abbildung 40: Überexpression von RUNX1-ETOr in K562 Zellen reprimiert die Expression von CD71 sowie des Clusters miR-144/451. ....	76
Abbildung 41: Überexpression von RUNX1-ETOr in K562 Zellen reprimiert die miR-451 Expression, während erneuter <i>Knockdown</i> die miR-451 Expression steigert. ....	77
Abbildung 42: Schematische Darstellung der doppelten Transduktion der hCD34+ Zellen mit cKit sowie RUNX1-ETOr ....	77
Abbildung 43: <i>Knockdown</i> von RUNX1-ETOr in RUNX1-ETOr und cKit überexprimierenden hCD34+ Zellen erhöht die Expression von CD71 sowie des Clusters miR-144/451. ....	78
Abbildung 44: RUNX1-ETO und RUNX1-ETOr wirken reprimierend auf die Aktivität des miR-144/451 Promotor- und Enhancerbereichs in K562 Zellen. ....	79
Abbildung 45: RUNX1-ETO (RE) und RUNX1-ETOr (REtr) binden an die Promotorregion des miR-144/451 Lokus in K562 und hCD34+ Zellen im ChIP-Assay. ....	79
Abbildung 46: Endogenes RUNX1-ETO okkupiert die Promotorregion des miR-144/451 Lokus in Kasumi-1 Zellen im ChIP-Assay. ....	80
Abbildung 47: In Anwesenheit von RUNX1-ETOr (RE tr) verringert sich die Okkupation von GATA1, RNA Polymerase II und WDR5 im Lokusbereich der miR-144/451 in K562 im ChIP-Assay. ....	81

---

Abbildung 48: In Anwesenheit von RUNX1-ETOr (RE tr) reduzieren sich die Histonmodifikationen H3K4me3 sowie H3K9Ac im Promotorbereich des miR-144/451 Lokus in K562 im ChIP-Assay.....	82
Abbildung 49: Modell der Okkupation des miR-144/451 Enhancer- bzw. Promotorbereichs durch die Transkriptionsfaktoren Tal1, GATA1 und RUNX1 während der Erythropoese sowie Megakaryopoese .....	88
Abbildung 50: Modell der Reprimierung der miR-144/451 Expression durch RUNX1-ETO .....	91

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einteilung der akuten myeloischen Leukämie nach FAB-Klassifikation [102].....	16
Tabelle 2: WHO-Klassifikation der akuten myeloischen Leukämie [104, 105] .....	16
Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Primärantikörper.....	28
Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Sekundärantikörper.....	29
Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Immunglobuline.....	29
Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Kits.....	29
Tabelle 7: Übersicht der verwendeten Primer zur Klonierung des humanen <i>GATA1</i> in den pcDNA3.1-Flag Vektor .....	30
Tabelle 8: Übersicht der verwendeten Primer zur Klonierung des humanen <i>GATA1</i> sowie <i>RUNX1-ETO</i> und <i>RUNX1-ETOtr</i> in den pLeGO-iG2 Vektor.....	31
Tabelle 9: Übersicht der verwendeten Primer zur Klonierung des humanen miR-144/451 Clusters in den pLeGO-G2 Vektor .....	31
Tabelle 10: Übersicht der verwendeten Primer für die Mutagenese der <i>Seed</i> -Sequenz der miR-144 und miR-451 .....	32
Tabelle 11: Übersicht der verwendeten shRNA-Sequenzen im pSEW Vektor.....	32
Tabelle 12: Übersicht der verwendeten shRNA-Sequenzen im pGIPZ Vektor.....	33
Tabelle 13: Übersicht der verwendeten Primer zur Klonierung des humanen miR-144/451 Promotors in den pGL4.10 Vektor .....	33
Tabelle 14: Übersicht der verwendeten Primer zur Klonierung des humanen miR-144/451 <i>Enhancers</i> in den pGL4.23 Vektor .....	34
Tabelle 15: qRT-PCR Programm zur Quantifizierung der cDNA .....	34
Tabelle 16: Übersicht der verwendeten Primer zur Messung der cDNA .....	35
Tabelle 17: qRT-PCR Programm zur Quantifizierung der miRNA.....	35
Tabelle 18: Übersicht der verwendeten Primer zur Messung der miRNA .....	36
Tabelle 19: Übersicht der verwendeten TaqMan-Sonden zur Messung der miRNA.....	36
Tabelle 20: PCR-Programm der reversen Transkription.....	36
Tabelle 21: qRT-PCR Programm zur Quantifizierung der miRNA mittels TaqMan .....	37
Tabelle 22: qRT-PCR Programm zur Quantifizierung der ChIP-DNA.....	37
Tabelle 23: Übersicht der verwendeten Primer zur Messung der ChIP-DNA.....	38
Tabelle 24: Zusammensetzung der verwendeten Puffer für ChIP .....	40
Tabelle 25: Zusammensetzung der verwendeten Puffer zur Herstellung von Gesamtzellextrakten ....	40
Tabelle 26: Zusammensetzung der verwendeten Puffer für Luciferase Assay .....	41
Tabelle 27: Zusammensetzung der verwendeten Puffer für $\beta$ -Galaktosidase Assay.....	41
Tabelle 28: Übersicht der verwendeten Zelllinien .....	41
Tabelle 29: Zusammensetzung des Expansionsmediums humaner CD34+ Zellen .....	43
Tabelle 30: Zusammensetzung des Differenzierungsmediums humaner CD34+ Zellen zu Erythrozyten .....	43
Tabelle 31: Zusammensetzung des Differenzierungsmediums humaner CD34+ Zellen zu Erythrozyten-Megakaryozyten-Vorläuferzellen .....	44

---

Tabelle 32: Zusammensetzung der verwendeten Puffer für die Ultrazentrifugation lentiviraler Partikel .....	45
Tabelle 33: Liste der 30 regulierten miRNAs in RUNX1 überexprimierenden K562 Zellen, die während der Hämatopoese von Bedeutung sind .....	49
Tabelle 34: Liste der 11 miRNAs, denen Aufgaben während der erythroiden bzw. megakaryozytären Differenzierung zugeschrieben werden .....	51
Tabelle 35: Ergebniss der miRNA-Sequenzierung von RUNX1 überexprimierenden K562 Zellen. Dargestellt ist die Expressionsveränderung der miRNAs zur Referenz (Leervektor). ....	93

## 1. Zusammenfassung

Hämatopoese bezeichnet den Prozess der Blutzellbildung ausgehend von hämatopoetischen Stammzellen (HSC). Aus HSCs entstehen multipotente Vorläuferzellen, die je nach Entwicklungslinie sich in oligopotente myeloide bzw. lymphoide Vorläuferzellen differenzieren können. Über weitere Entwicklungs- und Differenzierungsschritte entstehen schließlich ausdifferenzierte, reife Blutzellen, wie z.B. Erythrozyten oder B-Zellen [1, 2]. Die Regulation der hämatopoetischen Differenzierung unterliegt hierbei einer Vielzahl unterschiedlicher Mechanismen sowie Faktoren. Neben Zytokinen beeinflussen Transkriptionsfaktoren in einem präzise abgestimmten und hoch komplexen Netzwerk die Regulation der einzelnen Differenzierungsprozesse. Tal und RUNX1 gehören zu den essentiellen hämatopoetischen Transkriptionsfaktoren und sind u.a. für die Differenzierung der HSCs zu Erythrozyten sowie Megakaryozyten von großer Bedeutung [3, 4]. Des Weiteren sind microRNAs an vielen regulatorischen Prozessen der Hämatopoese beteiligt. Sie steuern sowohl die Selbsterneuerung der HSCs als auch deren Differenzierung in reife Blutzellen. MicroRNAs können hierbei sowohl von Transkriptionsfaktoren reguliert werden als auch deren Wirkung beeinflussen [5]. So wird die Expression der microRNA miR 451, welche zusammen mit miR-144 in einem Cluster lokalisiert ist, spezifisch durch den erythroiden Transkriptionsfaktor GATA-1 während der erythroiden Differenzierung induziert. Die Anwesenheit der miR-451 wiederum ist essentiell für die terminale Erythropoese [6, 7]. Darüber hinaus konnte in Studien gezeigt werden, dass die Expression der miR-451 in verschiedenen malignen Erkrankungen dereguliert ist und diese daher als diagnostischer Biomarker relevant sein könnte [8, 9].

Während der Leukämogenese sind diese essentiellen Bestandteile des regulatorischen Netzwerks vielfach Ziel von genetischen Modifikationen. Diese können u.a. zu einer aberranten Expression des Faktors oder gar zur Bildung von leukämischen Fusionsproteinen führen. So entsteht durch die chromosomale Translokation t(8;21)(q22;q22) das leukämische Fusionsproteins RUNX1-ETO [10]. Dieses wird in 12 % aller akuten myeloischen Leukämieerkrankungen nachgewiesen und besteht aus der N-terminalen Sequenz von RUNX1 und nahezu der vollständigen ETO-Sequenz am C-Terminus [11]. Auf diese Weise kombiniert RUNX1-ETO das DNA-Bindemotiv von RUNX1 (RHD-Domäne) mit den NHR-Domänen, die u.a. die Interaktion mit Co-Repressoren ermöglichen, im ETO-Anteil. Folglich ist RUNX1-ETO in der Lage, an RUNX1-Zielgene zu binden und deren Regulation über die Rekrutierung von Cofaktoren zu beeinflussen. Hierbei kann RUNX1-ETO sowohl aktivierend als auch reprimierend auf die Genexpression wirken [12-14].

---

In der vorliegenden Arbeit konnte in unterschiedlichen Zelllinien bzw. hCD34+ Zellen mittels Überexpressions- bzw. *Knockdown*-Experimenten der Zusammenhang zwischen der miR-451 Expression und der erythroiden Differenzierung aufgezeigt werden. Es besteht sowohl eine direkte Interaktion von Tal1 und GATA1 mit dem regulatorischen Bereich (*Enhancer*) des miR-451 Locus, als auch eine gezielte Aktivierung der miR-451 Expression bei Anwesenheit dieser essentiellen hämatopoetischen Transkriptionsfaktoren. Eine induzierte Überexpression der miR-451 in hCD34+ Zellen führte sowohl zur Ausbildung erythroider Kolonien als auch zur verstärkten Expression erythroider Oberflächenmarkergene, wie z.B. *CD71* und *GYP A*. Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass RUNX1 ebenfalls den Locus der miR-451 reguliert. Die Bindung von RUNX1 im Promotorbereich des Locus resultiert in einer verminderten Expression der miR-451 sowie erythroider Differenzierungsgene, während megakaryozytäre Gene, wie z.B. *CD41* verstärkt exprimiert werden. Die Anwesenheit dieser Transkriptionsfaktoren im Bereich des Enhancers bzw. Promotors wurde in verschiedenen Zelllinien bzw. hämatopoetischen Stammzellen ebenfalls während der erythroiden bzw. megakaryozytären Differenzierung untersucht. Ihre Bindung im miR-451 Locus verstärkte sich jeweils, sodass in erythroiden Zellen vermehrt GATA1 sowie Tal1 Bindung im Bereich des *Enhancers* festgestellt wurde während die Induktion der megakaryozytären Differenzierung zu einer verminderten Okkupation durch Tal1 und GATA1 führte, jedoch zu einer signifikant gesteigerten Präsenz von RUNX1 im Promotorbereich.

Die Tatsache, dass RUNX1-Bindemotive im Promotorbereich des miR-451 Clusters vorhanden sind und diese microRNA ein scheinbar wichtiger Faktor während der erythroiden Differenzierung ist, führte im zweiten Teil dieser Arbeit zu Untersuchungen, ob das leukämische Fusionsproteins RUNX-ETO die Expression der miR-451 beeinflusst. RUNX1-ETO entsteht durch chromosomale Aberrationen, die während der Ausprägung von akuter myeloischer Leukämie (AML) auftreten können. AML ist eine maligne Erkrankung, bei der die Myelopoese und damit ebenfalls die Bildung von Erythrozyten gestört ist, sodass sich unreife Vorläuferzellen im Blut anreichern. In dieser Arbeit konnte aufgezeigt werden, dass RUNX1-ETO im Allgemeinen die Expression erythroider Gene und damit direkt die erythroide Differenzierung reprimiert. Außerdem konnte eine direkte Interaktion von RUNX-ETO mit dem Promotorbereich des miR-451 Locus nachgewiesen werden. Die Expression des leukämischen Fusionsproteins resultierte des Weiteren in einer reduzierten Okkupation des Locus durch GATA1 und damit ebenfalls verminderten miR-451 Expression.

Somit konnte mit der vorliegenden Arbeit ein weiterer Aspekt geklärt werden, wie das leukämische Fusionsprotein RUNX1-ETO die hämatopoetische Differenzierung negativ

---

beeinflusst, sodass eine Akkumulation unreifer myeloider Vorläuferzellen im Blut sowie Knochenmark auftritt.

---

## 2. Einleitung

### 2.1. Hämatopoese

Als Hämatopoese wird der Prozess bezeichnet, bei dem die verschiedenen zellulären Bestandteile des Bluts gebildet und stetig erneuert werden. Hierbei wird zwischen der embryonalen und adulten Hämatopoese unterschieden, die während der Entwicklung wellenförmig an verschiedenen Orten abläuft [15]. In Vertebraten findet die primitive embryonale Hämatopoese im Dottersack des Embryos statt. Während das Wachstum des Embryos schnell voranschreitet, dient die primitive Hämatopoese zur Produktion von ersten primitiven nukleären Erythrozyten aus mesodermalen Zellen heraus. Auf diese Weise wird die Versorgung des Gewebes mit Sauerstoff sichergestellt [1]. Aus den gebildeten erythroiden Vorläuferzellen, die jedoch über keine Selbsterneuerungskapazität sowie Pluripotenz verfügen, entstehen Erythrozyten und Makrophagen [16]. Dieser Vorgang ist jedoch nur transient und wird schnell durch die definitive embryonale Hämatopoese ersetzt. Erste hämatopoetischen Stammzellen (*hematopoietic stem cells*, HSCs) werden in der Region der Aorten, Gonaden und des Mesonephros (AGM) des sich entwickelnden Embryos aus Endothelzellen gebildet und migrieren in die fötale Leber, Milz und Thymus. Diese Zellen besitzen nun die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Differenzierung in die verschiedenen Blutzellen. Anschließend migrieren die HSCs in das Knochenmark, dort findet im adulten Menschen die Hämatopoese hauptsächlich statt [17].

Hämatopoetische Stammzellen werden in Langzeit-repopulierende (*long-term* HSCs, LT-HSCs) und Kurzzeit-repopulierende Stammzellen (*short-term* HSCs, ST-HSCs) unterschieden. LT-HSCs befinden sich in bestimmten Bereichen des Knochenmarks, der sogenannten Stammzellnische, und besitzen die Fähigkeit sich ein Leben lang zu teilen, verweilen jedoch meist im G<sub>0</sub>-Stadium [18]. Nach der Aktivierung verlassen LT-HSCs die Nische und teilen sich asymmetrisch in eine LT- sowie eine ST-Stammzelle. ST-HSCs verlieren das Potential zur Selbsterneuerung und differenzieren zu multipotenten Vorläuferzellen (*multipotent progenitor cells*; MPPs) [19]. Die weitere Differenzierung der MPPs führt zur Entstehung von oligopotenten Vorläuferzellen, den lymphoiden (*common lymphoid progenitors*, CLP) und myeloischen (*common myeloid progenitors*, CMPs) Vorläuferzellen, deren Differenzierungspotential sich auf die jeweilige Linie beschränkt. Während der Lymphopoese differenzieren anschließend CLPs zu reifen B- und T-Lymphozyten sowie natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) [20]. Aus CMPs entstehen Megakaryozyten-Erythrozyten (MEP)- sowie Granulozyten-Makrophagen (GMP)-



---

Vorläuferzellen, die schließlich zur Entwicklung von Megakaryozyten und Erythrozyten sowie Granulozyten und Makrophagen führen [21].

### 2.1.1. Erythropoese

Erythrozyten bzw. rote Blutkörperchen sind essentiell für den Sauerstofftransport und entstehen im adulten Menschen aus hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark. Aus multipotenten Vorläuferzellen (MPP) bilden sich myeloische Vorläuferzellen (CMP), die sich weiter zu oligopotenten megakaryozytären-erythroiden Vorläuferzellen (MEP) differenzieren [20, 21]. Erste unreife Vorläuferzellen, die sich ausschließlich in Erythrozyten differenzieren können, werden als *burst forming unit-erythrocyte* (BFU-E) bezeichnet und können als große Kolonien mit mehreren tausend Hämoglobin-haltigen Zellen in Methylcellulosekulturen detektiert werden. Aus diesen bilden sich die etwas reiferen und von Erythropoetin (EPO) abhängigen erythroiden Vorläuferzellen *colony-forming units-erythrocyte* (CFU-E), deren Kolonien in Methylcellulose aus nur noch bis zu 125 Zellen bestehen [22]. In der terminalen erythroiden Differenzierung entstehen aus den CFU-E Zellen nachfolgend Proerythroblasten (Pro-E), basophile Erythroblasten (Baso-E), polychromatische Erythroblasten (Poly-E) und orthochromatische Erythroblasten (Ortho-E) [23]. Mit jeder mitotischen Teilung kondensiert der Zellkern und verdichtet sich das Hämoglobin im Zytoplasma, sodass der Erythroblast zunehmend kleiner wird und rot erscheint [24]. Mit dem Ausstoßen des Zellkerns, der sogenannten Enukleation, reift der Erythroblast zum Retikulozyten [25]. Durch Autophagie werden anschließend weitere Zellorganellen, wie zum Beispiel Mitochondrien und Ribosomen, entfernt. Daraufhin setzen sich die Proteine des Zytoskeletts in einem zweidimensionalen Netzwerk zusammen, sodass die typisch bikonkave Form des Erythrozyten erscheint (Abbildung 1). Dieser Prozess dauert etwa sieben Tage [26]. Die neugebildeten Erythrozyten besitzen eine durchschnittliche Lebenszeit von 120 Tagen und um den ständigen Bedarf an neuen Erythrozyten zu decken, werden pro Tag 1 % der Erythrozyten ersetzt und somit  $2 \cdot 10^{11}$  neue rote Blutkörperchen gebildet [27].

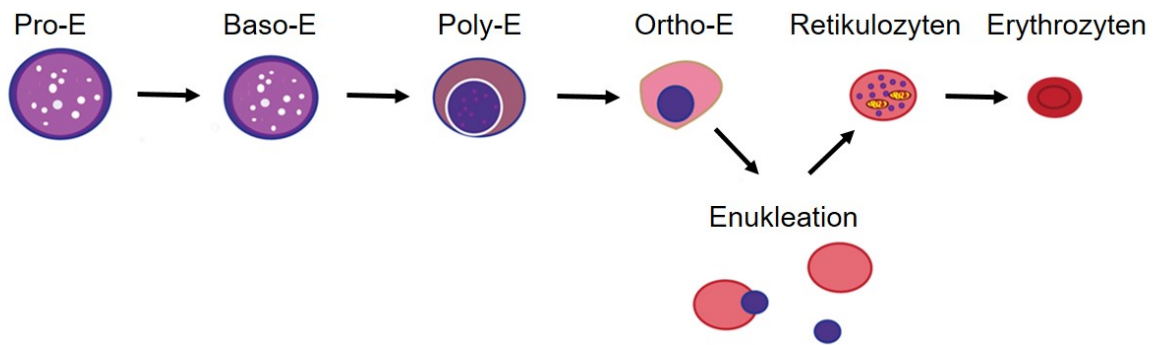


Abbildung 1: Reifestadien während der terminalen Erythropoese.

Die Entwicklungsstadien der terminalen Erythropoese werden als Proerythroblasten (Pro-E), basophile Erythroblasten (Baso-E), polychromatische Erythroblasten (Poly-E) und orthochromatische Erythroblasten (Ortho-E) bezeichnet. Nach der Eukleation entstehen Retikulozyten und schließlich reife Erythrozyten. Modifiziert nach [28].

Für die Reifung der Erythrozyten ist das Zusammenspiel von Zytokinen und Transkriptionsfaktoren essentiell. Neben dem Stammzellfaktor (SCF) ist vor allem Erythropoetin (EPO) bedeutend für die Erythropoese [29]. In CFU-E Zellen ist der Erythropoetinrezeptor (EPOR) das Schlüsselsignal zum Überleben der Zellen, da es durch die Bindung von EPO an seinen Rezeptor zu Konformationsänderungen kommt. Hierdurch werden intrazelluläre Proteindomänen in räumliche Nähe gebracht, die durch beiderseitige Phosphorylierungen Signalkaskaden auslösen. Somit werden CFU-E Zellen vor Apoptose geschützt, können proliferieren und schließlich differenzieren [30, 31].

Zu den wichtigsten Transkriptionsfaktoren, die die Erythropoese steuern, zählen TAL1, GATA1 sowie RUNX1. Diese sind nachfolgend näher erläutert.

### 2.1.2. Oberflächenmarker

Während der hämatopoetischen Differenzierung weisen die unterschiedlichen Entwicklungsstadien der HSCs einzigartige Expressionsmuster spezifischer Gene auf. Diese können daraufhin zur Klassifizierung der Zellen herangezogen werden. Mittels der Immunphänotypisierung wird die Expression von Antigenen auf der Zelloberfläche bestimmt. Unter Verwendung monoklonaler Antikörper lässt sich für jede Zelle ein spezifisches Profil aus Oberflächenmarkern, den *cluster of differentiation* (CD), erstellen. HSCs sowie die multipotenten hämatopoetischen Vorläuferzellen präsentieren CD34 auf ihrer Zelloberfläche, dieses wird jedoch bei fortschreitender Differenzierung herunterreguliert. Differenziertere hämatopoetische Zellen, die noch CD34 positiv sind, exprimieren zusätzlich linienspezifische Oberflächenmarker [32, 33]. CD41 wird ebenfalls auf hämatopoetischen Vorläuferzellen, aber insbesondere auf Zellen der megakaryozytären Differenzierungslinie gefunden. CD41 bildet zusammen mit CD61 den Fibrinogenrezeptor, der durch die Bindung von u. a. Fibrinogen und

---

Fibronectin die Aggregation der Thrombozyten sowie die Anlagerung an das Subendothelium vermittelt. Da das CD41-Antigen während der gesamten megakaryozytären Differenzierung auf den Zellen vorhanden ist, ist es ein geeigneter Oberflächenmarker um diese linienspezifische Differenzierung nachzuweisen [34, 35]. Zur Untersuchung der erythroiden Differenzierung werden die Oberflächenantigene CD71 und CD235a herangezogen. CD71 (Transferrin Rezeptor 1) ist ein integrales Membranglykoprotein, das die Aufnahme von Eisen in die Zelle vermittelt. Das Antigen wird besonders in frühen erythroiden Vorläuferzellen exprimiert und mit fortschreitender Reifung der Erythroblasten nimmt die Anwesenheit von CD71 auf der Zelloberfläche ab. Daher ist CD71 besonders geeignet die frühen erythroiden Differenzierungsstadien von den reiferen zu unterscheiden, die verstärkt CD235a bzw. Glycophorin A (GYPA) auf ihrer Zelloberfläche präsentieren [36, 37].

### **2.1.3. Regulation der Hämatopoese durch Zytokine**

Die Selbsterneuerung und Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen wird von einem präzise abgestimmten Netzwerk aus Zytokinen beeinflusst. Sowohl intrinsische Zytokine als auch extrinsische Signale aus der lokalen Nische können über das Schicksal der Stamm- oder Vorläuferzelle entscheiden. Zu den Zytokinen des hämatopoietischen Systems zählen Interleukine (IL), Kolonie-stimulierende Faktoren (CSF), Interferone, Erythropoetin (EPO) und Thrombopoetin (TPO). Diese aktivieren über verschiedene evolutionär konservierte Rezeptoren Signalkaskaden. Das von ihnen übermittelte Signal steuert die Genexpression zelllinienspezifisch und abhängig von dem intrazellulären Zustand der Zielzelle. Auf diese Weise können HSCs im ruhenden Zustand verbleiben, proliferieren oder sich zu reifen Zellen des Blutsystems differenzieren [38]. Während einige Zytokine verschiedene Differenzierungslinien beeinflussen und über ein breites Wirkungsspektrum verfügen, wie zum Beispiel der Stammzellfaktor (SCF), *FMS-like tyrosine kinase 3* (Flt-3), *granulocyte macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) und IL-3, wirken andere Zytokine spezifisch auf einzelne Differenzierungslinien oder -stadien. Hierzu zählen unter anderem *granulocyte colony-stimulating factor* (G-CSF), *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF) und Erythropoetin (EPO) [39]. In der nachfolgenden Abbildung 2 ist eine Übersicht der wichtigsten hämatopoetischen Zytokine dargestellt.

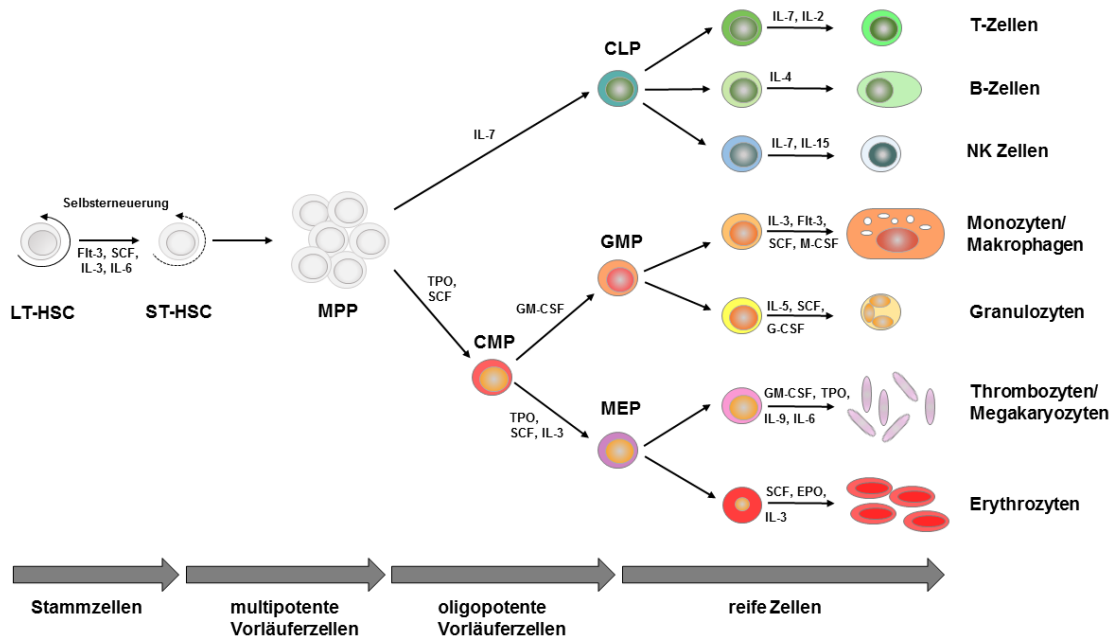


Abbildung 2: Schematische Darstellung der wichtigsten Differenzierungsstadien während der Hämatopoese. Langzeit-repopulierende Stammzellen (LT-HSC) sind zur Selbsterneuerung fähig und differenzieren über Kurzzeit-repopulierende (ST-HSC), die das Potential zur Selbsterneuerung zunehmend verlieren, zu multipotenten Vorläuferzellen (MPP). Im weiteren Differenzierungsprozess entstehen oligopotente Vorläuferzellen der lymphoiden (CLP) und myeloischen (CMP) Differenzierungslinien. Im Weiteren können sich die lymphoiden Vorläuferzellen zu B-, T- und natürlichen Killerzellen differenzieren, während zunächst aus den myeloischen Vorläuferzellen Megakaryozyten-Erythrozyten- (MEP)- sowie Granulozyten-Makrophagen (GMP)- Vorläuferzellen entstehen. Diese differenzieren im Anschluss zu reifen Thrombozyten und Erythrozyten sowie Granulozyten und Makrophagen. An dem Selbsterneuerungs- und Differenzierungsprozess der hämatopoetischen Stammzellen ist u.a. eine Vielzahl von Zytokinen beteiligt. Zu den wichtigsten Wachstumsfaktoren zählen der Stammzellfaktor (SCF), *FMS-like tyrosine kinase 3* (Flt-3), *granulocyte macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) und *granulocyte colony-stimulating factor* (G-CSF), *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF), Erythropoietin (EPO), Thrombopoietin (TPO) und die Interleukine IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7 und IL-15. Modifiziert nach [1, 39].

#### 2.1.4. Regulation der Hämatopoese durch Transkriptionsfaktoren

Hämatopoetische Stammzellen unterliegen während ihrer Entwicklung verschiedenen Differenzierungsprozessen. Diese werden neben den Zytokinen essentiell von Transkriptionsfaktoren gesteuert, die eine Schlüsselrolle in der Regulierung der Differenzierung einnehmen. Transkriptionsfaktoren agieren hierbei in einem komplexen, fein abgestimmten regulatorischen Netzwerk, welches die einzelnen Differenzierungsschritte während der embryonalen sowie adulten Hämatopoese steuert. Außerdem spielen Transkriptionsfaktoren eine entscheidende Rolle bei der Produktion, Selbsterneuerung sowie dem Überleben der HSCs [40].

Transkriptionsfaktoren weisen Proteindomänen auf, denen es ermöglicht an spezifische DNA-Sequenzen in der Promoter- oder Regulatorregion eines Zielgens zu binden. Über Protein-Protein-Interaktionen mit weiteren Transkriptionsfaktoren sowie epigenetischen Regulatoren bildet sich ein Proteinkomplex, der je nach Zusammensetzung einen aktivierenden oder reprimierenden Einfluss auf die Genexpression ausübt. Des Weiteren ist maßgeblich für die

Regulation der Genexpression die Verfügbarkeit der Transkriptionsfaktoren und weiterer Regulator- bzw. Cofaktorproteinen in der Zelle, die Bindungsaffinität an spezifische Sequenzabschnitte sowie der Einfluss von posttranslationalen Modifikationen. Zu den essentiellen Transkriptionsfaktoren während der Entwicklung der embryonalen und adulten Hämatopoese zählen Tal1, LMO2, MLL und RUNX1. Sie sind notwendig für die Selbsterneuerung, Produktion und das Überleben der HSCs. Die Erythropoese und Megakaryopoese wird hingegen linienspezifisch hauptsächlich durch die Transkriptionsfaktoren GATA1, Tal1, KLF1, RUNX1, FLI1 und PU.1 sowie deren Cofaktoren FOG1 und CBP/p300 reguliert [41-45] (Abbildung 3).

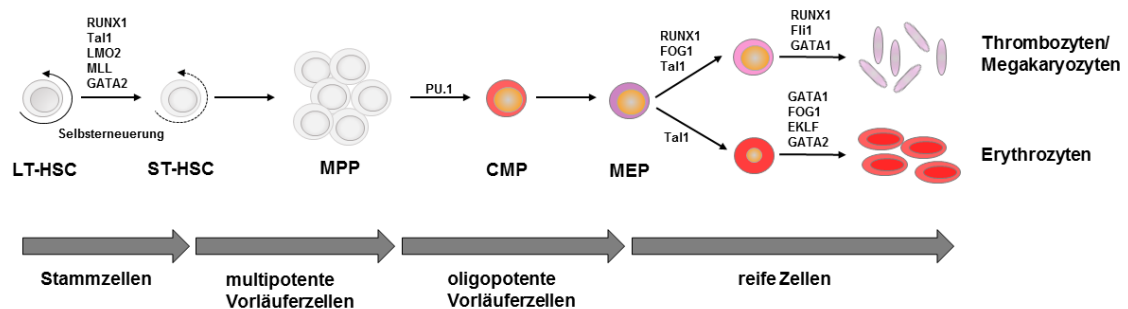


Abbildung 3: Regulation der Erythropoese und Megakaryopoese durch Transkriptionsfaktoren. Hämatopoetische Stammzellen (LT-HSC, ST-HSC) differenzieren über multipotenten Vorläuferzellen (MPP) zu den linienspezifischen myeloischen Vorläuferzellen (CMP) im Anschluss zu den Megakaryozyten-Erythrozyten-Vorläuferzellen (MEP). Über weitere Differenzierungsprozesse entstehen reife Thrombozyten und Erythrozyten. An dem Selbsterneuerungs- und Differenzierungsprozess der hämatopoetischen Stammzellen sind verschiedene Transkriptionsfaktoren beteiligt. Einige der wichtigsten sind RUNX1 (*Runt-related factor 1*), Tal1 (*T-cell acute lymphocytic leukemia 1*), LMO2 (*LIM domain only protein 2*), MLL (*mixed lineage-leukemia*), GATA2 (*GATA binding protein 2*), PU.1 (*spleen focus forming virus proviral integration oncogene spi1*), FOG1 (*friend of GATA1*), Fli1 (*friend of leukemia virus integration 1*), GATA1 (*GATA binding protein 1*), EKLf (*Krüppel-like factor 1*). Modifiziert nach [1, 46].

#### 2.1.4.1. Der Transkriptionsfaktor Tal1

Tal1 ist ein Transkriptionsfaktor aus der Familie der *basic helix-loop-helix* (bHLH)-Proteine und ein essentieller Regulator auf verschiedenen Ebenen der hämatopoetischen Entwicklung. Über die HLH-Domäne bildet Tal1 Heterodimere mit weiteren bHLH-Proteinen, den sogenannten E-Proteinen. Hierzu zählen u.a. E12, E47 und HEB. Die Tal1 Heterodimere binden sequenzspezifisch an E-box Motive (CANNTG) über die Aminosäurereste ihrer basischen (b) Region [47, 48].

Tal1 wurde ursprünglich als Ziel einer chromosomalen Translokation in der T-Zell akuten lymphatischen Leukämie (T-ALL) identifiziert. Das Tal1-Gen auf dem Chromosom 1 ist hierbei in den Locus des T-Zell Rezeptor  $\delta$  (TCR- $\delta$ ) auf dem Chromosom 14 transloziert, sodass Tal1 während der T-Zell-Entwicklung exprimiert wird. Da die Expression von Tal1 während der Differenzierung der T-Zellen im Normalfall herunterreguliert ist, scheint diese fehlerhafte Aktivierung von Tal1 und dessen Komplexbildung mit den Bindungspartnern LMO1 und LMO2

---

eine Hauptursache der T-Zell Leukämogenese zu sein. Anschließend Expressionsanalysen legten jedoch nahe, dass Tal1 eine wichtige Rolle während der normalen Hämatopoese einnimmt [49-52]. Während der primitiven Hämatopoese entstehen am Tag 7 (E7) der Embryogenese aus mesodermalen Vorläuferzellen im Dottersack und in der Aorta-Gonado-Mesonephros (AGM) Region primitive, kernhaltige Erythrozyten. Diese Zellen migrieren anschließend am Tag 11 (E11) in die fötale Leber, den hauptsächlichen Produktionsort für Blutzellen im Embryo [53]. Die entscheidende Bedeutung von Tal1 während der embryonalen hämatopoetischen Entwicklung wurde durch die Etablierung eines Tal1<sup>-/-</sup> *knock-out* Mausmodells deutlich. Die homozygoten Tal1<sup>-/-</sup> Embryos starben am Tag 9.5 (E9.5), waren blass und wiesen keine hämatopoetischen Zellen im Dottersack auf [54]. Um die Funktion und Wichtigkeit von Tal1 während der adulten Hämatopoese zu untersuchen, generierten Mark Hall und Kollegen eine transgene Maus mit einem konditionellen *knock-out* von Tal1 unter der Verwendung des Cre/Lox-Systems. Der *knock-out* war Interferon-induzierbar und resultierte in einer gestörten Megakaryopoese und Erythropoese, da frühe Vorläuferzellen beider Differenzierungslinien fehlten. Vorläuferzellen der Makrophagen- und Granulozyten-differenzierung waren hingegen von dem Tal1 *knock-out* nicht betroffen. Mittels dieser beiden Mausmodelle konnte gezeigt werden, dass Tal1 ein essentieller Transkriptionsfaktor während der frühen embryonalen Hämatopoese ist. Jedoch ist Tal1 ebenfalls unverzichtbar für die Differenzierung der Erythrozyten und Megakaryozyten in der adulten Hämatopoese [3].

#### **2.1.4.2. Der Transkriptionsfaktor GATA1**

GATA1 ist ein Transkriptionsfaktor aus der GATA-Familie. Diese besteht in Wirbeltieren aus sechs Proteinen und regulieren die Transkription während der embryonalen Entwicklung sowie hämatopoetischen Zelldifferenzierung. Alle GATA-Proteine besitzen ein oder zwei Zink-Finger DNA-Bindedomänen, die hoch konserviert sind und die Bindung an die Konsensus-Sequenz (A/T)GATA(A/G) vermittelt [55]. Die Genexpression von *GATA1* ist in HSCs unterdrückt und wird erst durch die Bindung von GATA2 an den *GATA1* Locus während der hämatopoetischen Differenzierung erhöht. Hierbei ist die *GATA1* Expression auf die erythroide und megakaryozytäre Differenzierungslinie beschränkt. Die gesteigerte Expression von *GATA1* initiiert die Erythropoese in Megakaryozyten-Erythrozyten-Vorläuferzellen (MEPs) [56, 57]. GATA1 interagiert mit einer Vielzahl von Coregulatoren, die die Aktivität von GATA1 modulieren. Einer der bedeutendsten ist FOG1 (*friend of GATA1*), der während der hämatopoetischen Entwicklung mit *GATA1* co-exprimiert wird. Die Interaktion von GATA1 mit FOG1 wird durch die Zink-Finger-Domäne am N-Terminus vermittelt, während über die C-terminale Zink-Finger-Domäne die Bindung an die DNA erfolgt [58, 59]. Eine abnormale Expression von GATA1 wurde in unterschiedlichen Krankheiten, wie unter anderem in

---

Thrombozytopenie und makrozytäre Anämie sowie in Leukämien bei Patienten mit Down Syndrom, festgestellt [60-62]. Mittels *in vivo* Experimenten konnte die essentielle Rolle von GATA1 für die Reifung von Erythrozyten und Megakaryozyten aufgezeigt werden. Eine Inaktivierung des *GATA1* Locus auf dem X-Chromosom während der embryonalen Erythropoese ist bei männlichen Embryos zwischen Tag 10.5 und 11.5 (E10.5-11.5) letal. Die Embryos sind am Tag 9.5 sehr blass, da die Differenzierung der erythroiden Zellen im Proerythroblasten-Stadium gestoppt ist und daher keine embryonalen, erythroiden Zellen generiert werden. Weibliche heterozygote (*GATA1*<sup>+/-</sup>) Mäuse sind bei der Geburt blasser als Wildtyp-Mäuse durch die Inaktivierung von *GATA1* auf einem X-Chromosom, jedoch überwinden die Mäuse diese Einschränkung durch die Selektion von hämatopoetischen Vorläuferzellen, die beide normalen Allele tragen [63]. Ein konditioneller *GATA1 knock-out* spezifisch in der megakaryozytären Differenzierungslinie von Mäusen resultierte in einer stark erhöhten Proliferation von Megakaryozyten im Knochenmark, während die Anzahl an reifen, funktionellen Thrombozyten abnimmt [64].

#### 2.1.4.3. Der Transkriptionsfaktor RUNX1

Der Transkriptionsfaktor RUNX1 (*Runt-related transcription factor 1*; AML1, *acute myeloid leukemia 1*) gehört zu der Familie der RUNX Proteine, die bei Säugetieren aus drei Mitglieder besteht, RUNX1, RUNX2 und RUNX3. N-Terminal besitzen RUNX Proteine eine 128 Aminosäuren umfassende DNA-Bindedomäne, die *runt homology*-Domäne (RHD). Diese ist von *Drosophila* bis zum Menschen hoch konserviert und vermittelt ebenfalls die Bindung mit weiteren Transkriptionsfaktoren, wie beispielsweise zu GATA1 und PU.1, und dem Cofaktor CBF $\beta$ . RUNX1 bindet spezifisch an die Sequenz TGT/cGGT und die DNA-Bindung von RUNX1 wird durch die Heterodimerisierung mit CBF $\beta$  verstärkt [65-68]. Am C-Terminus von RUNX1 sind das Kernlokalisierungssignal, eine inhibitorische Domäne, eine Transaktivierungsdomäne und das VWPRY-Motiv lokalisiert. Mittels dieser C-terminalen Domänen assoziiert RUNX1 mit Cofaktoren, wie unter anderem p300/CBP und Sin3a, und moduliert in Abhängigkeit der rekrutierten Cofaktoren die Expression des Zielgens [69-71]. RUNX1 ist ein bedeutender Transkriptionsfaktor in der embryonalen sowie adulten hämatopoetischen Entwicklung. Während der Embryogenese ist die Aktivität von RUNX1 essentiell für die Ausbildung hämatopoetischer Stammzellen aus speziellen Endothelzellen (*hemogenic endothelium*) heraus [4]. Ein *knock-out* von *RUNX1* ist embryonal lethal am Tag 12.5 (E12.5). Die primitive Hämatopoese ist bei den Mausembryos nicht betroffen, jedoch kommt es zu keiner Entwicklung der definitiven Hämatopoese. So finden sich in der fötalen Leber der *RUNX1*<sup>-/-</sup> Embryos keine hämatopoetischen Zellen der verschiedenen Differenzierungslinien [72]. In Experimenten mit adulten Mäusen, die einen konditionellen *RUNX1 knock-out*



---

aufweisen, konnte gezeigt werden, dass RUNX1 nicht mehr für die Erhaltung der HSCs von Bedeutung ist, jedoch für die megakaryozytäre Differenzierung. Denn die *knock-out* Mäuse wiesen eine 5-fach geringere Thrombozytenanzahl auf, die Megakaryozyten besaßen hypoblobulierte Zellkerne und erscheinen zudem kleiner als normal [73, 74]. Die Differenzierung der erythroiden-megakaryozytären Vorläuferzellen zu reifen Megakaryozyten ist demnach abhängig von dem RUNX1-Proteingehalt. Während die Expression von RUNX1 während der Erythropoese abnimmt, wird diese hochreguliert während der Megakaryopoese [67].

Die Bedeutung von RUNX1 während der Hämatopoese wird besonders deutlich bei der Betrachtung verschiedener Leukämien, die oft genetische Modifikationen durch chromosomale Translokationen, Mutationen und Deletionen des *RUNX1*-Gens aufweisen. Die häufigsten chromosomalen Translokationen sind t(8;21)(q22;q22) und inv(16)(p13;q22) in etwa 25 % der adulten akuten myeloischen Leukämien (AML) sowie t(12;21)(p13;q22) in 20-25 % der pädiatrischen akuten lymphatischen Leukämie (ALL) [10, 68, 75, 76]. Die hierbei entstehenden Fusionsproteine, wie zum Beispiel RUNX1-ETO, interferieren oft mit der transkriptionellen Aktivierung durch RUNX1 und wirken daher oft als direkte Repressoren [77].

## **2.2. Epigenetik**

Die klassische Definition der Epigenetik besagt, dass Veränderungen auf chromosomaler Ebene ohne Änderungen in der DNA-Sequenz einen stabil vererbbaaren Phänotyp verursachen. Epigenetik als Begriff wurde hierbei erstmals im Jahr 1942 von Conrad Waddington formuliert [78]. Zu den vererbbaaren chromosomalen Modifikationen zählen die Methylierung der DNA sowie die posttranslationalen Modifikationen der N- und C-terminalen Histonenden. Dies beinhaltet u. a. die Phosphorylierung, Acetylierung, Methylierung, Ubiquitinierung, Sumoylierung, Carbonylierung, Biotinylierung und Citrullinierung. Die Haltbarkeit der einzelnen Histonmodifikationen variiert jedoch erheblich. Während Histonmethylierungen relativ stabil sind und über die mitotische Teilung hinweg erhalten bleiben können, sind Acetylierungen und Phosphorylierungen dynamischer. Ihre Halbwertszeit variiert zwischen einigen Minuten bis Stunden [79, 80]. Die Anwesenheit verschiedener Histonmodifikationen beeinflusst die Struktur des Chromatins sowie die Zugänglichkeit der DNA. Dies wirkt sich direkt auf zelluläre Prozesse, wie u.a. Transkription, Induktion von Apoptose sowie DNA-Reparatur, aus. Daher können fehlerhafte chromosomale Modifikationen zu einer abnormalen Genexpression und schließlich zur Entstehung von Krankheiten führen [81]. Im nachfolgenden werden der Aufbau des Chromatins sowie die Modifikationen der Histone näher dargestellt.



### 2.2.1. Chromatinstruktur

Die eukaryotische genomische DNA ist dicht gepackt in einem komplexen Geflecht aus DNA und Proteinen und im Zellkern, dem Nukleus, lokalisiert. Die Kondensation der DNA erfolgt schrittweise und kann in einzelne Ebenen, wie in Abbildung 4 dargestellt, unterschieden werden.

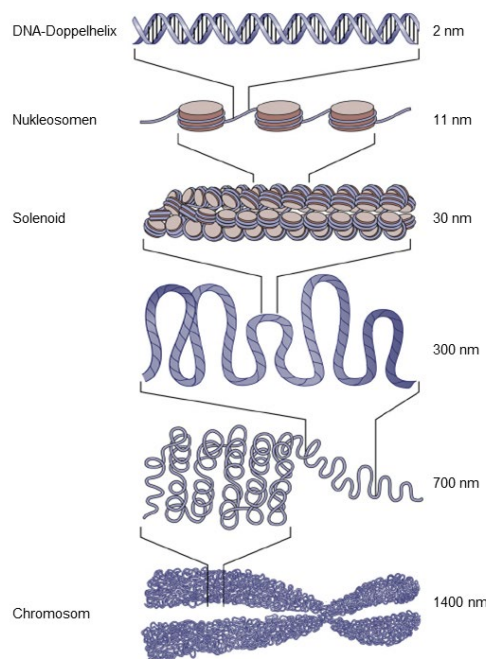


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Chromatinstruktur.

Schrittweiser Aufbau des Chromatins in eukaryotischen Zellen. Die DNA-Doppelhelix bildet zusammen mit den Histonproteinen die Nukleosomen. Diese reihen sich kettenförmig aneinander und durch weiteres Umwinden entsteht das Solenoid bzw. die 30 nm Faser. Weitere Kondensationsschritte führen schließlich zur Ausbildung des Chromosoms. Modifiziert nach [82].

Zunächst winden sich 145 - 147 Basenpaare der DNA-Doppelhelix um ein Oktamer aus zwei Kopien der Histonproteine H2A, H2B, H3 und H4 und bilden das Nukleosom [83]. Die unstrukturierten N- und C-terminalen Enden der Histone sind hierbei zugänglich für posttranslationale Modifikationen. Linker-Histone (z.B. H1 oder H5) lagern sich an das Nukleosom an und beeinflussen somit die Orientierung der Linker-DNA zum Nukleosom [84, 85]. Die Linker-DNA besitzt eine Länge von 20-90 bp und verbindet zwei Nukleosomen miteinander, sodass die Struktur als „*beads in a string*“ erscheint. Durch Schlaufenbildung entsteht das Solenoid oder auch die sogenannte 30 nm-Faser. Es folgen weitere Kondensierungen und Faltungen bis das Chromosom final gebildet ist [86].

### 2.2.2. Histonmodifikationen

Histone sind kleine (bis zu 20 kDa) Proteine, die durch einen hohen Anteil der basischen Aminosäuren Arginin und Lysin positiv geladen sind. Die Histone sind evolutionär hoch konserviert und werden in fünf Hauptklassen unterschieden: H1, H2A, H2B, H3 und H4. Alle Histone besitzen drei  $\alpha$ -helikale Strukturen, die die Heterodimerisierung der Histone ermöglicht [87]. Die weniger strukturierten N- und C-terminalen Histonenden, die aus dem Nukleosom herausragen, dienen der Interaktion zwischen den Nukleosomen sowie als Plattform für Transkriptionsfaktoren und Chromatin modifizierende Enzyme [88]. Posttranslationale Modifikationen der Histone regulieren ganz entscheidend den Kondensationsgrad des Chromatins. Während die Mehrheit der Modifikationen an den Histonenden erfolgt, wurde auch Modifikationen innerhalb der globulären Domänen gefunden. Diese beeinflussen die Interaktion zwischen den Histonen und der DNA sowie innerhalb der Histondimeren [89].

Bisher wurden u.a. folgende posttranslationale Modifikationen beschrieben: Phosphorylierung, Acetylierung, Methylierung, Glykosylierung, Ubiquitinierung, Sumoylierung, Deiminierung, Prolinisomerisierung und Citrullinierung. Die Modifikationen können sowohl die gleiche Aminosäure betreffen als auch die Anwesenheit weiterer Modifikationen in räumlicher Nähe beeinflussen. Dies wird als „*cross-talk*“ zwischen den Histonmodifikationen bezeichnet [90].

Die Aminosäure Lysin kann gleich mehrere Modifikationen tragen. So kann sie sowohl phosphoryliert als auch methyliert und acetyliert werden. Hierbei tritt bei Lysinen eine Mono-, Di- und Trimethylierung auf, während u. a. auf Arginin nur eine oder zwei Methylgruppen übertragen werden kann. Diese Variabilität der Modifikationen sowie ihre gegenseitige Beeinflussung führte im Jahr 2000 zur Formulierung des Histoncodes [91]. Die Modifikationen an den Histonenden bestimmen somit, ob das Chromatin zugänglich ist und welche Proteine zum Chromatin rekrutiert werden. Dies beeinflusst direkt die transkriptionelle Genregulation sowie DNA-Replikation und -Reparatur in den jeweiligen Bereichen des Chromatins [90]. So führt die Acetylierung von Lysinen zur Neutralisierung der positiven Ladung der Seitenkette und damit zur Entfaltung des Chromatins. Dies hat zur Folge, dass DNA-Bereiche nun für Enzyme zugänglich werden und die Transkription stattfinden kann [92]. Diese offenen Chromatinbereiche werden als Euchromatin bezeichnet, während nicht zugängliche Abschnitte des Chromatins als Heterochromatin definiert werden. Im Gegensatz dazu führt die Entfernung der Acetylgruppen durch Histondeacetylasen (HDACs) zur Komprimierung der Chromatinstruktur und Genrepression [93]. Die Methylierung von Lysinen kann die Genexpression sowohl aktivieren als auch reprimieren. Der Einfluss auf die Transkription ist hierbei abhängig von dem jeweiligen Aminosäurerest sowie von dem Ausmaß der Methylierung (Mono-, Di- oder Trimethylierung). Diese Variabilität der posttranslationalen

---

Modifikationen führt zu einer stark erhöhten Komplexität der transkriptionellen Genregulation [90].

### **2.3. Akute myeloische Leukämie (AML)**

Akute myeloische Leukämie ist eine der häufigsten akuten Leukämien bei Erwachsenen und die Wahrscheinlichkeit einer Erkrankung steigt mit dem Alter. Unter 65 Jahren treten pro 100000 Menschen ca. 1,3 Neuerkrankungen auf, während es nach 65 Jahren 12,2 neue Fälle sind. Hierbei ist besonders fatal, dass die Heilung der jüngeren Patienten sich zwar signifikant verbessert hat auf bis zu 40%, jedoch nicht die der älteren Betroffenen. Nur 5 % bis 15% der Patienten über 60 Jahren können geheilt werden, da oftmals keine intensive Chemotherapie ohne schwerwiegende Nebeneffekte angewendet werden kann. Somit beträgt die durchschnittliche Überlebensdauer älterer Patienten oft nur 5 bis 10 Monate [94, 95].

AML ist eine maligne Erkrankung, die gekennzeichnet ist durch die klonale Expansion myeloider Vorläuferzellen im peripheren Blut sowie im Knochenmark. Die Blastzellen sind etwas größer als normale Lymphozyten und besitzen ebenfalls größere Zellkerne, die in ihrer Gestalt sowie der Anzahl der Kernkörperchen variieren können. Der Ausbruch von AML erfolgt in der Mehrheit der Fälle in gesunden Menschen, jedoch kann AML auch zusätzlich in Patienten mit schon bestehenden hämatologischen Erkrankungen, wie zum Beispiel dem Down Syndrom, Bloom Syndrom oder der Fanconi Anämie, oder als Folge einer Therapie entstehen [96]. Erkrankte leiden oft an Thrombozytopenie, Anämie, körperliche Erschöpfung, starkem Gewichtsverlust sowie Blutungen und Infektionen [97].

In 97 % der AML Fälle konnten genetische Mutationen nachgewiesen werden, die die Grundlage zur Klassifizierung der AML darstellen [98]. Nach dem „*two-hit model*“ von Gilliland und Griffin zur Leukämieentstehung muss eine Mutation zur Aktivierung von Signalwegen, die ein starkes proliferierendes Zellwachstum steuern, führen (Klasse I) und gleichzeitig muss eine weitere Mutation die normale hämatopoetische Differenzierung stören (Klasse II). So zählen unter anderem Mutationen in den Transkriptionsfaktoren *RUNX1* und *C/EBPα* sowie chromatische Aberrationen, die zur Produktion von Fusionsproteinen wie RUNX1-ETO in t(8;21) und CBFβ-MYH11 in inv(16) führen, zur Klasse II Mutationen [99-101].

In 1976 versuchte das French-American-British (FAB) Klassifizierungssystem erstmals die verschiedenen Arten von AML in acht Untergruppen (M0 bis M7) anhand der Zytomorphologie zu unterteilen (Tabelle 1).

Tabelle 1: Einteilung der akuten myeloischen Leukämie nach FAB-Klassifikation [102]

FAB-Subtyp	Bezeichnung	typische Zytogenetische Aberrationen
M0	AML mit minimaler myeloischer Differenzierung	
M1	AML ohne Ausreifung	
M2	AML mit Ausreifung	t(8;21), t(6;9)
M3	Akute Promyelozytenleukämie	t(15;17), t(5;17), t(11;17)
M4	Akute myelomonozytäre Leukämie	
M4eos	Akute myelomonozytäre Leukämie mit Eosinophilie	inv(16), t(16;16)
M5a	Akute Monoblastenleukämie	
M5b	Akute Monozytenleukämie	
M6	Akute Erythroleukämie	
M7	Akute Megakaryoblastenleukämie	

Ab 2001 wurde das System von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) mehrfach überarbeitet und zuletzt 2016 erweitert, da zusehends Fortschritte in der Charakterisierung betroffener Zellen hinsichtlich der genetischen Informationen sowie dem klinischen Erscheinungsbild und der Prognose Betroffener gemacht wurden [103] (Tabelle 2).

Tabelle 2: WHO-Klassifikation der akuten myeloischen Leukämie [104, 105]

#### AML mit rekurrenten zytogenetischen Aberrationen

- AML mit t(8;21)(q22;q22), AML1-ETO
- Akute Promyelozytenleukämie [AML mit t(15;17)(q22;q11-12) und Varianten, PML/RAR $\alpha$ ]
- AML mit abnormen Knochenmarkeosinophilen [inv(16)(p13q22) oder t(16;16)(p13;q11), CBF $\beta$ /MYH11]
- AML mit 11q23(MLL)-Aberrationen

#### AML mit Multiliniendysplasie

- AML mit vorangegangenem myelodysplastischem Syndrom
- AML ohne vorangegangenes myelodysplastisches Syndrom

#### therapieassoziierte AML und myelodysplastisches Syndrom

- Alkylanzienassoziiert
- Etoposidassoziiert

#### AML ohne weitere Spezifizierung

- Akute myelomonozytäre Leukämie
- Akute monozytäre Leukämie
- Minimal differenzierte AML
- AML ohne Reifung
- AML mit Reifung
- Akute erythroide Leukämie
- Akute megakaryozytäre Leukämie
- Akute basophile Leukämie
- Akute Panmyelose mit Myelofibrose

---

Seit 1970 blieb die primäre Behandlung mit intensiver Induktionschemotherapie unverändert. Erkrankte jüngeren Alters (unter 60 Jahren) sowie sonst gesunde ältere Patienten erhalten eine „7+3“ Induktionschemotherapie mit Cytarabin und Anthracyclin bis zur vollständigen morphologischen Remission. Diese erreichen 65-73 % der jüngeren Ersterkrankten und 38-65 % der AML-Patienten über 60 Jahren [106, 107]. Die Feststellung des allgemeinen Gesundheitszustandes der AML Erkrankten ist generell von großer Bedeutung für die Auswahl der jeweiligen Behandlungsstrategie, da besonders bei den älteren Patienten die Induktionschemotherapie nicht mehr angewendet werden kann und auf andere Therapiemöglichkeiten zurückgegriffen werden muss [108]. Zur Vermeidung eines Rückfalls bzw. einer Wiedererkrankung schließt sich der ersten intensiven Induktionschemotherapie eine weitere Chemotherapie mit weniger hohen Dosen von Cytarabin oft in Kombination mit einer hämatopoetischen Stammzelltransplantation an [109]. 50-60 % der Patienten, die eine Stammzelltransplantation von einem allogenen Spender erhalten haben, sind im Anschluss geheilt [110]. Da jedoch oft ein passender Spender nicht verfügbar ist oder aber eine komplette Remission nicht erreicht werden kann, wird nach neuen alternativen Therapien gesucht. Hypomethylierende Reagenzien, wie zum Beispiel Decitabin und Azacitidin, scheinen bei älteren Patienten die Lebenserwartung um etwa 4 Monate zu verlängern [111]. Doch die Erkenntnis, dass spezifische Mutationen und genetische Modifikationen für die Ausprägung von AML verantwortlich sind, führte zur Entwicklung neuer gezielter Therapien und Inhibitoren. Derzeit werden verschiedene *Flt-3* (*Fms-like tyrosine kinase 3*) Inhibitoren in klinische Studien untersucht, da *Flt-3* stark in HSCs exprimiert wird und dort von großer Bedeutung ist für die Proliferation und das Zellüberleben [112]. Ein weiterer Fokus liegt auf der Immuntherapie. Hierbei werden unter anderem dem Patienten oder einem passenden Spender Lymphozyten entnommen, die anschließend genetisch modifiziert und dem Patienten wieder verabreicht werden. Ein Beispiel sind CAR (*chimeric antigen receptor*) -modifizierte T-Zellen. Diese präsentieren auf ihrer Zelloberfläche einen T-Zellrezeptor, der Antigenbindedomänen gegen Immunglobuline aufweist, die spezifisch sind für leukämische Oberflächenproteine. Auf diese Weise binden die T-Zellen spezifisch an die leukämischen Zellen und induzieren über die Aktivierung des T-Zellrezeptors die Zytotoxizität [113]. Diese Methode sowie ein weiterer Ansatz, bei dem angereicherte NK-Zellen verabreicht werden, können vor allem angewendet werden um einen Rückfall nach vorheriger Behandlung gegen AML zu unterbinden [114].

### **2.3.1. Das leukämische Fusionsprotein RUNX1-ETO**

Wie zuvor beschrieben, ist der Transkriptionsfaktor RUNX1 in Leukämien oft genetisch modifiziert. In etwa 12 % aller AML-Erkrankungen und 40 % des M2-Subtyps von AML wird

das Fusionsprotein RUNX1-ETO, welches durch eine der häufigsten chromosomalen Translokation t(8;21) entsteht, gefunden.

1973 wurde als erstes von Janet Rowley, die Proben von Leukämiepatienten untersuchte, die 8;21 Translokation mit den Bruchstellen bei 8q22 und 21q22.3 entdeckt (Abbildung 5) [115]. Die beiden Gene, die an diesen Bruchstellen liegen, wurden daraufhin Anfang 1990 von mehreren Gruppen als RUNX1 und ETO identifiziert [116, 117].

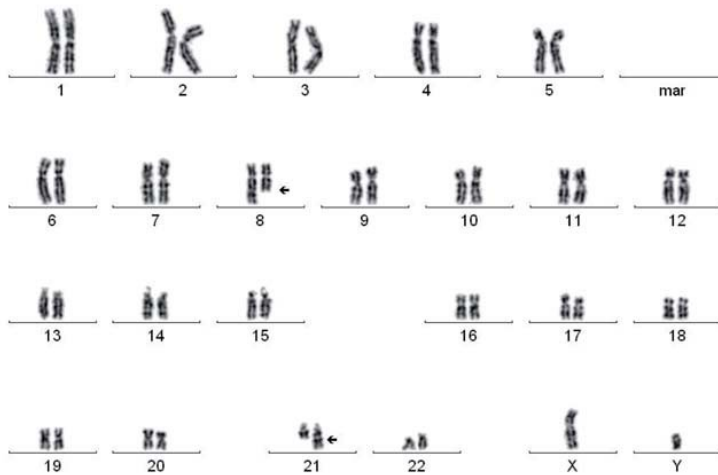


Abbildung 5: Analyse der Chromosomen eines männlichen AML-Patienten mit der Translokation t(8;21)(q22;q22). Der Pfeil markiert die Bruchstelle am Chromosom 8 und die Fusionsstelle am Chromosom 21 [105].

### 2.3.2. Domänenstruktur von RUNX1-ETO

Das *RUNX1*-Gen auf dem Chromosom 21 besteht aus den Exons 1-8 und der Locus umspannt 260 kb. Die Regulation der *RUNX1*-Expression erfolgt über einen proximalen P2 sowie distalen P1 Promoter. Durch alternatives Spleißen entstehen hierbei drei *RUNX1*-Varianten (*RUNX1* a-c) [118-120]. Das *ETO* (*Eight-Twenty-One*; *RUNX1T1*, *MTG8*) -Gen befindet sich auf dem Chromosom 8 und besteht aus 13 Exons, die sich über 87 kb spannen. Alternative Spleiß-Varianten sind ebenfalls von ETO bekannt. Die Einbeziehung des Exons 9a in die mRNA führt zu einer Verschiebung des Leserasters, sodass ein Stopcodon an Position 400 bzw. 427 entsteht und die Transkripte am C-Terminus um 177 Basen verkürzt sind. Dies hat zur Folge, dass den trunkierten ETO-Proteinen die beiden C-terminalen Zink-Finger-Domänen sowie die P/S/T-reiche Domäne fehlen, wodurch die Interaktion mit weiteren Proteinen gestört ist [121]. ETO-Proteine weisen vier hoch konservierte *nervy homology region* (NHR) Domänen auf, die die Interaktion mit einer Vielzahl von aktivierenden sowie repressiven Cofaktoren vermitteln [122]. Bei der chromosomalen Translokation befinden sich die Bruchstellen im *RUNX1*-Lokus im Intron 5 und im Intron 1 des *ETO*-Lokus. Es sind verschiedene Bruchstellen innerhalb der jeweiligen Introns bekannt, jedoch entsteht immer das gleiche Fusionsprodukt,

da keine weiteren Spleißakzeptorstellen vorhanden sind [11]. *RUNX1-ETO* besteht somit aus der N-terminalen Sequenz von *RUNX1* und nahezu dem vollständigen *ETO*-Gen am C-Terminus.

### 2.3.3. Interaktionspartner von RUNX1-ETO

RUNX1-ETO beeinflusst die Expression von tausenden von Genen durch seine zusammengesetzte Domänenstruktur. Über die RHD Domäne im N-terminalen RUNX1-Teil kann RUNX1-ETO an DNA-Sequenzen, die dem Bindemotiv von RUNX1 entsprechen, binden. Die RH-Domäne erlaubt ebenfalls die Interaktion mit Cofaktoren, die an diese Region in RUNX1 binden. Durch die im C-terminalen ETO-Anteil gelegenen NHR-Domänen erfolgt die Interaktion mit vornehmlich Co-Repressoren, die nun zur DNA rekrutiert werden und die Genexpression reprimieren (Abbildung 6). Auf diese Weise entsteht ein hoch komplexes Netzwerk aus Cofaktoren, die die Expression von RUNX1-Zielgenen beeinflusst [123].

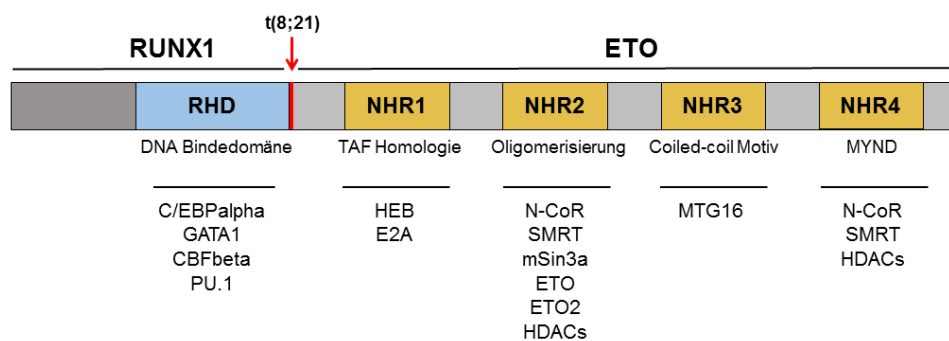


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von RUNX1-ETO und dessen Interaktionspartnern. RUNX1-ETO besteht aus 752 Aminosäuren und besitzt N-Terminal die *runt homology* Domäne (RHD) des RUNX1-Proteins, die die Bindung an die DNA vermittelt. C-Terminal schließt sich nahezu das vollständige ETO-Protein mit den inkludierten *nervy homology* Regionen (NHR) 1-4 an. NHR1 weist eine Homologie zu den TAF Proteinen auf und erlaubt die Interaktion mit E-Proteinen, wie HEB und E2A. Die Oligomerisierung von RUNX1-ETO erfolgt über die NHR2, die ebenfalls für die Interaktion mit Co-Repressoren, wie N-CoR, SMRT und Sin3a sowie ETO und ETO2 verantwortlich ist. Die NHR3 Domäne beinhaltet ein coiled-coil Motiv, während die NHR4 Domäne, die auch als *myeloid-nervy-DEAF1* (MYND)-Domäne bezeichnet wird, ein Zinkchelate-Motiv aufweist. Modifiziert nach [124].

Die NHR2 und NHR4 Domänen sind bedeutend für die Interaktionen mit Corepressoren wie unter anderem Sin3a, N-CoR und SMRT, die wiederum die Histondeacetylasen (HDAC) 1-3 rekrutieren. Dies führt zur Repression der Genexpression, da die Ausbildung des Heterochromatins gefördert wird. Außerdem ist die NHR2 Domäne essentiell für die Oligomerisierung von RUNX1-ETO sowie für die Interaktion mit ETO und dessen Homologe [12, 125]. RUNX1-ETO interagiert ebenfalls direkt mit der DNA-Methyltransferase 1 (DNMT1) und dessen Rekrutierung zum Interleukin-3 Promotor führt zum Beispiel zur Reprimierung der Genexpression [126]. So beschreiben viele verschiedene Gruppen, dass RUNX1-ETO spezifisch RUNX1-Zielgene epigenetisch reprimiert durch den Anstieg repressiver Histonmodifikationen, wie die H3K9 und H3K27 Methylierungen [13, 127]. Interessanter Weise



---

interagiert der transkriptionelle Aktivator p300, der Histonreste acetyliert, mit der NHR1 Domäne im ETO-Anteil. RUNX1-ETO und p300 wurden zusammen auf Promotoren von Genen, wie *p21* und *Id1*, die wichtig für die Selbsterneuerung sind und deren Genexpression von RUNX1-ETO aktiviert wird, gefunden. Des Weiteren scheint die Acetylierung von RUNX1-ETO durch p300 ein wichtiger Bestandteil bei der Induzierung der Leukämie durch RUNX1-ETO zu sein [14].

Somit kann RUNX1-ETO sowohl als Aktivator als auch als Repressor der Genexpression wirken. Dies scheint abhängig zu sein von posttranslationalen Modifikationen an RUNX1-ETO direkt sowie der Interaktion mit Corepressoren und p300.

#### **2.3.4. RUNX1-ETO im Tiermodell**

Der Einfluss von RUNX1-ETO auf die Hämatopoese wurde in verschiedenen Tiermodellen untersucht. In *Drosophila* führt die *RUNX1-ETO* Expression zur Expansion von unreifen Vorläuferzellen des Blutsystems [128]. Im Zebrafisch, der zu den Vertebraten zählt und ein ähnliches Blut- und Organsystem wie Säugetiere besitzt, zeigen sich durch die induzierbare Expression von *RUNX1-ETO* Symptome ähnlich der in AML-Patienten. Es kommt zur Akkumulation unreifer Blastzellen und es findet keine normale hämatopoetische Entwicklung statt [129]. In verschiedenen Ansätzen wurde der Einfluss von RUNX1-ETO auch im Mausmodell evaluiert. Im Mausmodell mit einem Tetrazyklin-induzierbaren Expressionssystem konnte gezeigt werden, dass das Volllängeprotein von RUNX1-ETO mit 752 Aminosäuren Leukämie nicht alleine induzieren kann, sondern eine schon zuvor erwähnte zweite Mutation, wie zum Beispiel in Flt-3, benötigt. Die RUNX1-ETO9a Spleißvariante mit 572 Aminosäuren, die fast identisch zur trunkierten RUNX1-ETO Variante mit 552 Aminosäuren ist, hingegen kann sehr schnell und alleine, wie das trunkierte Fusionsprotein, Leukämie induzieren [130-133]. Des Weiteren konnte aufgezeigt werden, dass die Expression von *RUNX1-ETO* in Mäusen embryonal lethal ist, da keine definitive hämatopoetische Entwicklung stattfindet. Die *RUNX1-ETO* heterozygoten Embryonen sterben etwa am Tag 13.5 (E13.5), ähnlich den *RUNX1* defizienten Mausembryos. Jedoch weisen *RUNX1-ETO*<sup>+/+</sup> Embryos im Gegensatz dazu zusätzlich abnormale Monozyten oder dysplastische hämatopoetische Vorläuferzellen, die eine ungewöhnlich hohe Selbsterneuerungsrate besitzen, auf. Daher scheint RUNX1-ETO nicht nur die normale biologische Funktion von RUNX1 zu ersetzen und damit als dominant-negativer Regulator zu agieren, sondern auch direkt eine fehlerhafte Proliferation der HCSs auszulösen [134-136].



---

### 2.3.5. Zielgene von RUNX1-ETO

RUNX1-ETO besitzt wie RUNX1 die *runt homology* Domäne und somit ist im Allgemeinen anzunehmen, dass RUNX1-ETO an DNA-Sequenzen von RUNX1 Zielgenen binden und die Expression dieser beeinflussen kann. Es konnte jedoch sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt werden, dass RUNX1-ETO bevorzugt an mindestens doppelt vorhandene RUNX1 DNA-Bindemotive bindet. Hierbei war nicht entscheidend, ob es sich um die trunkierten RUNX1-ETO9a bzw. RUNX1-ETOtr oder aber das Volllängeprotein handelte [137].

Der wissenschaftliche Fokus zur Identifizierung von RUNX1-ETOs Zielgenen liegt vornehmlich auf Genen, die bei Leukämie differentiell exprimiert sind oder aber diese unterstützen. Als eines der ersten direkten Zielgene wurde das Tumorsuppressorgen  $p14^{ARF}$  identifiziert. Während RUNX1 die Expression von  $p14^{ARF}$  stimuliert, führt die Bindung von RUNX1-ETO an dessen Promotorbereich zur Repression. Da  $p14^{ARF}$  somit als Tumorsuppressor im p53 Signalweg nicht mehr wirken kann, wird die Tumorentstehung damit bevorteilt [138]. RUNX1-ETO kann jedoch auch als transkriptioneller Aktivator agieren. Dies konnte für den negativen Zellzyklusregulator  $p21^{WAF1}$  in RUNX1-ETO exprimierenden hämatopoetischen Stammzellen und Zelllinien nachgewiesen werden, nachdem in AML-Patienten eine erhöhte  $p21^{WAF1}$  Expression gefunden wurde.  $p21^{WAF1}$  blockiert die Aktivität Zellzyklus-abhängiger Kinasen und schützt vor Apoptose in verschiedenen leukämischen Zelllinien. Es konnte gezeigt werden, dass RUNX1-ETO direkt an den Promotorbereich von  $p21^{WAF1}$  bindet und diesen aktiviert, sodass die  $p21^{WAF1}$  Expression verstärkt wird [139-142]. RUNX1-ETO reguliert jedoch nicht nur die Expression wichtiger Proteine, sondern auch von microRNAs (miRNAs). Durch genomweite Analysen von AML-Patienten konnte gezeigt werden, dass das miRNA Expressionsmuster bei den unterschiedlichen chromosomalen Translokationen verschieden ist. In Patienten, die die t(8;21) Translokation aufwiesen, war die miR-126/126\* überexprimiert. In nachfolgenden Experimenten mit AML-Zellen konnte gezeigt werden, dass die miR-126 Apoptose inhibiert und für ein erhöhtes Zellüberleben verantwortlich ist [143]. Im Gegensatz dazu konnte aufgezeigt werden, dass RUNX1-ETO die Expression der miR-223 durch die Rekrutierung Chromatin beeinflussender Enzyme reprimiert. RUNX1-ETO bindet direkt an RUNX1-Bindestellen im Promotorbereich der miR-223 und rekrutiert sowohl HDACs als auch DNMTs, sodass die Ausbildung des Heterochromatins verstärkt wird und keine Expression mehr möglich ist. Da die miR-223 bei der Differenzierung myeloider Vorläuferzellen von großer Bedeutung ist, führt die RUNX1-ETO induzierte Expressionsreprimierung zur Differenzierungsblockade der myeloiden Vorläuferzellen [144].

---

## 2.4. microRNAs

MicroRNAs (miRNAs) gehören mit einer Länge von 18-24 Nukleotiden zu der Klasse der kleinen RNA-Moleküle, die nicht für Proteine kodieren [145]. Bei diesen endogenen RNA-Molekülen handelt es sich um hochkonservierte Sequenzen in den Genomen von Tieren, Pflanzen, Pilzen und Viren [146]. Zurzeit sind über 2500 humane miRNAs in der miRNA Datenbank „miRBase“ [147] gelistet und die Tendenz ist steigend, nachdem die erste miRNA lin-4 von Victor Ambros und seinen Kollegen 1993 in *Caenorhabditis elegans* entdeckt wurde. Hierbei handelte es sich um eine RNA-Sequenz von 22 Nukleotiden, die nicht für ein Protein kodierte sondern komplementäre Sequenzen zu der 3' untranslatierten Region (UTR) der lin-14 mRNA aufwies. Es wurde daraufhin festgestellt, dass lin-4 die Translation von lin-14 durch eine *antisense* Interaktion von RNA-RNA-Molekülen blockiert [148]. Dieser Mechanismus ist bekannt als RNA Interferenz.

### 2.4.1. Biogenese und Wirkmechanismus der microRNAs

Etwa 30 % der microRNA Gene sind innerhalb von Proteinkodierenden Introns lokalisiert, sodass ihre Expression zusammen mit dem Protein erfolgt. Die meisten miRNAs besitzen jedoch einen eigenen Genloкус, der die direkte Expression durch die RNA Polymerase II ermöglicht [149]. Verwandte miRNAs sind darüber hinaus oft in Clustern lokalisiert, sodass eine koordinierte Expression aller miRNA Gene gleichzeitig erfolgen kann [150].

Die Biogenese der miRNAs erfolgt in zwei räumlich voneinander getrennten Prozessen im Zellkern bzw. Zytoplasma (Abbildung 7). Im Menschen werden die miRNAs als ein über 1 kb langes Primärtranskript (pri-miRNA) mittels der RNA Polymerase II generiert. Diese pri-miRNA weist eine *stem-loop* Struktur auf und besitzt am 5' Ende ein 7-Methylguanosin sowie am 3' Ende einen poly A-Schwanz [151]. Drosha, eine RNase III Endonuklease, schneidet am 3' und 5' Ende des Stammes mit den RNase III Domänen (R11a/b), sodass am 3' Ende ein Überhang von zwei Nukleotiden entsteht [152]. Dies erfolgt in dem Mikroprozessor-Komplex zusammen mit dem Cofaktor DGCR8 (*DiGeorge syndrome critical region 8*). Die beiden Doppelstrang-RNA-Bindedomänen von DGCR8 erkennen hierbei die pri-miRNA, während der C-Terminus die Interaktion mit Drosha vermittelt [153]. Die entstandene pre-miRNA weist nach der Prozessierung eine *Hairpin*-ähnliche Struktur von etwa 60 bis 70 Nukleotiden auf und wird anschließend zur Reifung in das Zytoplasma exportiert [154]. Für den Export formt die pre-miRNA zusammen mit dem Protein Exportin 5 und dem GTP-Bindeprotein Ran-GTP einen Komplex. Während der Translokation durch die Zellkernpore wird GTP hydrolysiert, sodass der Komplex im Zytoplasma aufgelöst wird [155, 156]. Dicer, ebenfalls eine RNase III Endonuklease, bindet an die pre-miRNA bevorzugt mit einem 3' Überhang von zwei

Nukleotiden, die von Drosha generiert wurden und spaltet mit den RNase III Domänen (RIIIa/b) in einem Abstand von 21 bis 25 Nukleotiden zum 3'Ende die Doppelstrang-RNA [157]. Die Effektivität der Prozessierung mancher pre-miRNAs und deren Länge als reife miRNAs wird von TRBP, dem TAR RNA-Bindeprotein, durch die Interaktion mit Dicer moduliert [158]. Der entstandene 18 bis 24 Nukleotid lange RNA-Doppelstrang, bestehend aus der reifen miRNA und deren komplementären Gegensequenz (miRNA\*), wird von den Argonaute-Proteinen (AGO1-4) gebunden, sodass sich der *RNA-induced silencing complex* (RISC) formiert. Der RISC-Komplex entwindet mittels einer Helikaseaktivität das miRNA-Duplex und der miRNA\*-Strang wird degradiert, während die reife miRNA im RISC-Komplex verbleibt (miRISC) [159]. Die miRNA im RISC leitet den Komplex zur Ziel-mRNA und bindet diese meist in der 3'UTR. Hierbei ist die Sequenzkomplementarität der Nukleotide zwei bis acht am 5'Ende der miRNA, die auch *seed*-Sequenz genannt wird, essentiell für die Zielerkennung. Ist diese Sequenzkomplementarität nahezu perfekt und damit ausreichend, wird die mRNA gespalten und abgebaut. Ist die Komplementarität jedoch nur unzureichend, wie es oft in Säugetieren der Fall ist, so wird nur die Translation inhibiert [160].

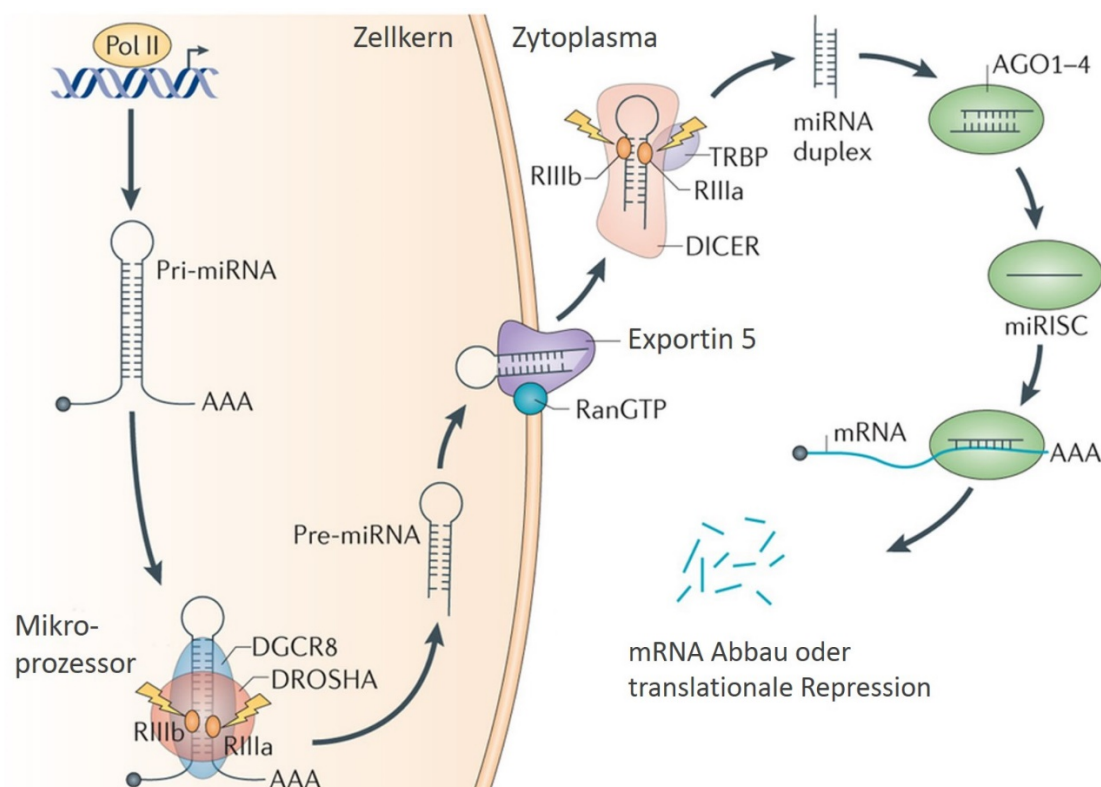


Abbildung 7: Synthese der microRNAs.

MicroRNA Gene werden durch die RNA Polymerase II im Zellkern transkribiert und es entsteht das Primärtranskript, die pri-miRNA. Die pri-miRNA wird anschließend im Mikroprozessor von Drosha und DGCR8 gespalten, sodass der Vorläufer pre-miRNA entsteht. Der Transport aus dem Zellkern in das Zytoplasma der pre-miRNA erfolgt durch Exportin 5 und Ran-GTP. Die finale Prozessierung findet hier durch die Abspaltung der *loop*-Region durch Dicer und TRBP statt. Das entstandene miRNA-Duplexmolekül bestehend aus der reifen miRNA und der komplementären miRNA\* wird in den *RNA-induced silencing complex* (RISC) inkorporiert und durch eine Helikase entwunden. Das miRNA\*-Fragment wird abgebaut, während die reife miRNA den aktiven miRISC-Komplex bildet.

---

Dieser bindet komplementäre Sequenzen in der 3'UTR von Ziel-mRNAs, wodurch dessen Translation inhibiert oder aber die mRNA abgebaut wird. Modifiziert nach [161].

#### 2.4.2. microRNAs in der Hämatopoese

MicroRNAs sind an allen Prozessen in der Hämatopoese beteiligt. Sie beeinflussen sowohl den Erhalt der Selbsterneuerung der hämatopoetischen Stammzellen als auch deren Differenzierung in reife Blutzellen. Hierbei ist die Regulation der miRNAs und deren Interaktionen mit Transkriptionsfaktoren von großer Bedeutung, sowohl als Regulator als auch Zielstruktur.

Für die Familie der miR-125 (miR-125a/125b1/125b2) konnte gezeigt werden, dass diese miRNAs stark in hämatopoetischen Stammzellen sowie Vorläuferzellen exprimiert werden, jedoch nimmt die Expression während der Differenzierung ab [162]. Dies deutet darauf hin, dass die Mitglieder dieser miRNA-Familie von essentieller Bedeutung sind bei vielen verschiedenen zellulären Prozessen. Hierzu zählen u.a. die Zelldifferenzierung und -proliferation sowie Apoptose, indem sie verschiedene Transkriptionsfaktoren, Matrixmetalloproteasen und Wachstumsfaktoren beeinflussen [163, 164]. Ein weiteres Beispiel ist das Cluster der *HOX*-Gene. Die Proteine der *HOX*-Familie sind Transkriptionsfaktoren, die essentiell für die embryonale bzw. adulte Entwicklung sowie Hämatopoese sind. Neben den *HOX*-Proteinen codiert das Cluster auch für Mitglieder der miR-196 Familie, deren Expression mit der bestimmter *HOX*-Proteine korreliert. Es konnte gezeigt werden, dass u. a. *HOXA7* und *HOXA8* direkte Ziele der miR-196b sind und auf diese Weise die Expression der *HOX*-Gene ausbalanciert bzw. während der Differenzierung herunterreguliert wird [165].

microRNAs sind jedoch nicht nur von großer Bedeutung bei der Erhaltung der HSCs, sondern auch deren Differenzierung in die verschiedenen Linien. Hierfür müssen stillgelegte Differenzierungsgene aktiviert werden, während Stammzellgene abgeschaltet werden müssen. Dieser Prozess ist streng kontrolliert durch Transkriptionsfaktoren, die wiederum durch miRNAs reguliert werden. Während der megakaryozytären Differenzierung ist der Transkriptionsfaktor *RUNX1* sowie die miR-27a von großer Bedeutung. Die Expression von *RUNX1* wird in der frühen Hämatopoese aktiviert und dies wiederum führt zu einer gesteigerten miR-27a Expression. In einem *Feedback-Loop* reprimiert die miR-27a, die Bindestellen in der 3'UTR von *RUNX1* besitzt, nun die Expression von *RUNX1* während der Megakaryopoese [166]. Weitere wichtige miRNAs, die in die Differenzierung der Megakaryozyten involviert sind, konnten identifiziert werden. MiR-34a fördert die Megakaryozytenentwicklung, indem sie cMyb und Cyclin-abhängige Kinasen reprimiert, wodurch die Proliferation der HSCs gestört wird [167]. *cMyb* ist ebenfalls ein Ziel der miR-150 in Megakaryozyten-Erythrozyten-Vorläuferzellen (MEP), sodass die Repression von cMyb die

---

Entscheidung der Differenzierung in Richtung der megakaryozytären Linie begünstigt [168]. Expressionsanalysen während der erythroiden Differenzierung zeigten, dass die microRNAs miR-150, miR-155, miR-221 und miR-222 herunterreguliert sind, während andere microRNAs, wie miR-451, miR-15b und miR-16 hochreguliert vorliegen. Deren Expression korreliert direkt mit dem Erscheinen erythroider Markerproteine, während sich die Expression der miR-28 invers zur Markerproteinexpression verhält [169]. Darüber hinaus sind weitere miRNAs in der Regulation der Lymphopoese beteiligt, wie u.a. miR-150, miR-181 und das miR-17-92 Cluster [5].

### 2.4.3. microRNAs in malignen Erkrankungen

Da microRNAs ein bedeutender Bestandteil der Regulation zellspezifischer Prozesse sind, kann deren Fehlregulation zu malignen Krankheiten führen. So wird vermutet, dass eine anormale Expression von miRNAs auch eine entscheidende Rolle bei der Krebsentwicklung spielt. So kann für eine genauere Klassifizierung einer vorliegenden Krebserkrankung nun neben der bisherigen klassischen mRNA Expressionsanalysen auch die Analyse hinsichtlich der Expression von miRNAs genutzt werden.

Calin und Mitarbeiter konnten 2002 erstmals eine Verbindung zwischen einer Krebserkrankung und miRNAs herstellen. Sie fanden heraus, dass die Genregion der beiden miRNAs miR-15 und miR-16 in einer 30 bp kleinen Region des Chromosoms 13q14 lokalisiert ist, welche in mehr als 65 % der B-Zell chronischen lymphatischen Leukämie (B-CLL) Patienten deletiert ist. Somit ist die Expression der miR-15 und miR-16 in B-CLL herunterreguliert oder gänzlich abwesend [170]. Weitergehend konnten sie feststellen, dass miRNA Gene nicht zufällig im Genom angeordnet sind, sondern eine Vielzahl von miRNA Genen in sogenannten *fragile sites* lokalisiert sind. Für diese Genomregionen konnte gezeigt werden, dass diese die Instabilität der DNA in Krebszellen begünstigen. Außerdem sind sie oft Teil von chromosomalen Modifizierungen, wie u.a. Translokationen und Deletionen [171]. In neueren Studien konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass Proteine, die an der miRNA Prozessierung und Reifung beteiligt sind, ebenfalls Ziele sind für genetische Mutationen darstellen. Dies betrifft u.a. die Proteine TARBP2 und Exportin 5 [172, 173]. Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass epigenetische Veränderungen, wie anormale DNA-Methylierungen und Histonmodifikationen, ein Hauptgrund für die fehlregulierte miRNA Expression in malignen Erkrankungen sind. Mit Hilfe von genomweiten *Deep-Sequencing* Analysen konnte herausgefunden werden, dass miRNA Gene, deren Expression in Krebserkrankungen vermindert ist, eine reduzierte Anwesenheit der aktiven Histonmodifikation H3K4me3 und dafür im Gegenzug ein hohes Level der repressiven

Histonmodifikation H3K9me2 aufweisen. Außerdem konnte aufgezeigt werden, dass miRNA Promotoren oft von einer CpG-Insel Hypermethylierung betroffen sind, wodurch die Expression reprimiert wird [174]. Viele Studien wurden durchgeführt und es konnten für die unterschiedlichen Tumore und Krebsarten abweichende miRNA Expressionsprofile erarbeitet werden. Damit ergab sich die Hypothese, dass miRNAs einen maßgeblichen Einfluss auf die Pathogenese von Krebserkrankungen haben. Sie können deswegen nicht nur zur Klassifizierung von Krebssubtypen herangezogen werden, sondern könnten auch als neue Zielstrukturen für die Krebstherapie dienen. So konnte gezeigt werden, dass *BCL2* ein Ziel der miR-15 und miR-16 ist, deren Expressionen invers korrelieren mit der *BCL2* Expression in CLL. Beide miRNAs reprimieren die Expression von *BCL2* posttranslational, sodass dies in Therapieansätzen genutzt werden könnte um die Überexpression von *BCL2* in Tumoren abzuschwächen [175]. Jedoch können miRNAs nicht nur als Tumorsuppressoren wirken, sondern auch als Onkogene (oncomirs). So ist die Expression der microRNA miR-155 in einigen Erkrankungen, u.a. Hodgkin Lymphoma, B-Zell-Lymphoma sowie Brustkrebst, stark erhöht, woraufhin die Expression von *c-Myc*, einem essentiellen Transkriptionsfaktor, ebenfalls stark erhöht wird. Die Überexpression von *c-Myc* wird mit vielen weiteren Krebserkrankungen assoziiert, da *c-Myc* die unkontrollierte Zellproliferation unterstützt [176, 177].

#### 2.4.4. microRNA Cluster miR-144/451

Die Gene der miR-144 und miR-451 sind zusammen in einem Cluster auf dem Chromosom 17q11.2 lokalisiert. Hierbei befindet sich der miR-144/451 Locus in der intergenischen Region des Proteinkodierenden Gens *ERAL1* (*Era G-protein-like 1*), welches jedoch in die entgegengesetzte Richtung transkribiert wird. Die kodierende Sequenz beider reifer miRNAs ist in Wirbeltieren hoch konserviert [178, 179]. Eine Darstellung des miR-144/451 Locus ist in der Abbildung 8 gezeigt.

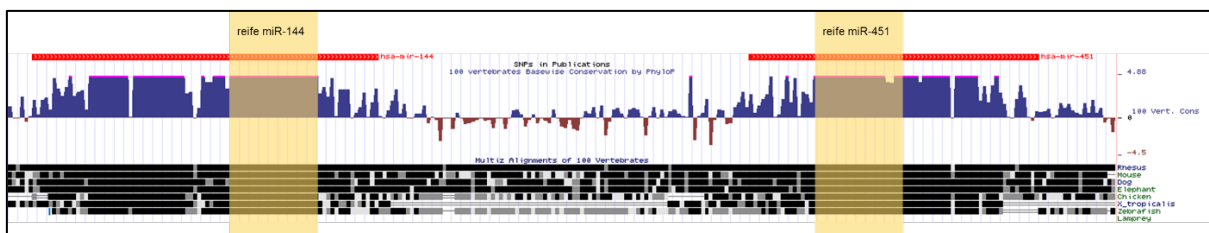


Abbildung 8: Darstellung des Locus des miR-144/451 Clusters im University of California Santa Cruz Genome (UCSC) Browser. Gelb hinterlegt ist der Bereich der reifen miRNA-144 bzw. miR-451. Diese Sequenz ist hoch konserviert in Wirbeltieren.

Dore und Mitarbeiter konnten in Experimenten mit einem Zebrafisch-Modell aufzeigen, dass die Abwesenheit der miR-451 in Zebrafischembryos zu einer schweren Anämie und einer verminderten Expression erythroider Markerproteine führt. Sie schlossen aus ihren



---

Ergebnissen, dass die miR-451 für die spätere Reifung bzw. den Erhalt der erythroiden Vorläuferzellen im Zebrafisch wichtig ist. Mit Hilfe eines murinen Zellsystems konnten sie herausfinden, dass die Expression der miR-451 vornehmlich auf die erythroide Linie beschränkt ist und dass der Lokus des miR-144/451 Clusters von GATA1 spezifisch während der erythroiden Differenzierung aktiviert wird. Mit Chromatin-Immunoprecipitations-experimenten in murinen Zellen konnten sie darüber hinaus feststellen, dass GATA1 in einem regulatorischen Bereich 2,8 kb *upstream* des Clusters bindet [7]. MiR-144/451<sup>-/-</sup> Mäuse wurden normal geboren, zeigten jedoch eine leichte Anämie sowie Retikulozytose mit einer Anreicherung unreifer erythroider Vorläuferzellen im Knochenmark und Milz. Die adulte Hämatopoese der miR-144/451<sup>-/-</sup> Mäuse wies Defekte in der terminalen Erythropoese auf [180, 181]. Dies und die Tatsache, dass die miR-451 Expression während der Erythropoese ansteigt und ihr Maximum im letzten Erythroblastenstadium sowie Retikulozyten erreicht wird, deutet daraufhin, dass miR-451 von essentieller Bedeutung für die terminale Erythropoese ist [6]. Für die miR-144 konnten Fu und Mitarbeiter im Zebrafisch-Modell zeigen, dass diese miRNA während bestimmter Differenzierungsstadien exprimiert wird und dass die miR-144 die Expression des embryonalen  $\alpha$ -Hämoglobins negativ reguliert, jedoch nicht die des  $\beta$ -Hämoglobins. Dies erfolgt über die posttranslationale Repression des *Krüppel-like factor D* (*klfD*) durch die Bindung der miR-144 an dessen 3'UTR. KlfD, ein erythroider Transkriptionsfaktor, bindet sowohl an den Promotor des erythroiden  $\alpha$ -Hämoglobins als auch des miR-144/451 Clusters, und aktiviert deren Expression. Dies ergibt einen *Feedback-Loop* zur Expressionsregulation des erythroiden  $\alpha$ -Hämoglobins während der primitiven Erythropoese [182]. Jedoch gibt es kein orthologes Protein zum Zebrafisch KlfD im Säugetiersystem, es besteht jedoch eine hohe Sequenzhomologie zum humanen KLF1 [183]. In weiteren Experimenten konnte gezeigt werden, dass die miR-144 einen größeren Einfluss auf die primitive und adulte Hämatopoese in Zebrafischen ausübt über die Regulierung der Expression wichtiger Transkriptionsfaktoren, wie u.a. Tal1, GATA1, RUNX1 und PU.1. Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass die miR-144 die Bildung des Gefäßsystems im Zebrafisch reguliert [184]. Diese Experimente sowie weiterführende miRNA Expressionsanalysen in verschiedenen Spezies haben ergeben, dass die miRNAs miR-144 und miR-451 vornehmlich in erythroiden Zellen exprimiert werden [185, 186].

Die miR-451 scheint außerdem außerhalb ihrer Rolle für die erythroide Differenzierung auch als Tumorsuppressor in verschiedenen malignen Erkrankungen von Bedeutung zu sein. Neuere Studien zeigen sogar, dass miR-451 als diagnostischer Biomarker eingesetzt werden könnte [8, 9]. In verschiedenen Untersuchungen konnte aufgezeigt werden, dass die Expression der miR-451 in Tumorerkrankungen oft dereguliert ist und sich so die These ergibt, dass die microRNA miR-451 eine entscheidende Rolle in der Onkogenese einnimmt. Es

konnte gezeigt werden, dass die Überexpression der miR-451 das Wachstum von Glioblastomazellen inhibiert und deren Apoptose fördert [187]. Des Weiteren inhibiert die miR-451 das Wachstum der Speiseröhrenkrebszelllinie EC9706 sowie der Zellen des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms (NSCLC) und Leberzellkarzinoms. Neuste Forschungen zeigen, dass die Expression der miR-451 ebenfalls bei Magenkrebs, Darmkrebs, Osteosarkomen sowie Eierstockkrebs herunterreguliert ist [188-194].

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Chemikalien und Geräte

Eine Auflistung der verwendeten Chemikalien und Geräte sowie deren Herkunft befindet sich im Anhang.

#### 3.2. Antikörper

Die folgenden Antikörper wurden entweder für eine Chromatin-Immunopräzipitation (IP) oder im Western Blot (WB) verwendet.

Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Primärantikörper

Name	Spezies	Verwendung	Beschreibung	Hersteller
anti-ETO	Ziege	5 µg/IP	polyklonaler Antikörper gegen den C-Terminus	Santa Cruz (sc-9737)
anti-GATA1	Kaninchen	10 µl	polyklonaler Antikörper gegen die Aminosäuren um das Prolin 401	Cell Signaling (4591S)
anti-HA	Maus	1:1000 für WB	monoklonaler Antikörper gegen das HA-Peptid CYPYDVPDYASL (1 mg/ml)	Covance, (MMS101P)
anti-HA	Kaninchen	5 µg/IP	polyklonaler Antikörper gegen das Epitop YPYDVPDYA	Abcam (ab9110)
anti-H3	Kaninchen	3 µg/IP	polyklonaler Antikörper gegen den C-Terminus des humanen Histon-H3	Abcam, (ab1791)
anti-H3K4me3	Maus	3 µg/IP	monoklonaler Antikörper gegen das trimethylierte Lysin 4 des Histon H3	Abcam (ab1012)
anti-H3K9Ac	Kaninchen	3 µg/IP	polyklonaler Antikörper gegen das acetylierte Lysin 9 des Histons H3	Abcam (ab10812)
anti-LaminB1	Kaninchen	1:1000 für WB	polyklonaler Antikörper gegen ein Peptid der Aminosäuren 400-500 des murinen LaminB1 (1 mg/ml)	Abcam (ab16048)
anti-Sin3A	Kaninchen	5 µg/IP	polyklonaler Antikörper gegen das Epitop MKRRLDDQESDVYAAQRR	Abcam (ab3479)
anti-p300	Maus	5 µg/IP	monoklonaler Antikörper gegen ein Peptid der Aminosäuren 2071-2091	Abcam (ab3164)



Name	Spezies	Verwendung	Beschreibung	Hersteller
anti-RNA-Pol II CTD	Maus	3 µg/IP	monoklonaler Antikörper gegen das Peptid YSPTSPS der RNA Polymerase II	Abcam (ab5408)
anti-RUNX1	Kaninchen	5 µg/IP	polyklonaler Antikörper gegen ein Peptid der Aminosäuren 200-300	Abcam (ab23980)
anti-Tal1	Kaninchen	5 µg/IP	polyklonaler Antikörper gegen den N-Terminus	OriGene (TA590662-OR)
anti-Tal1	Kaninchen	5 µg/IP	polyklonaler Antikörper gegen die Aminosäuren um das Serin 122	Abcam (ab75739)
anti-WDR5	Kaninchen	10 µl	monoklonaler Antikörper gegen das Volllänge-Protein	Cell Signaling (#13105)

Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Sekundärantikörper

Name	Spezies	Verwendung	Beschreibung	Hersteller
anti-Maus IgG-HRP	Ziege	1:5000 für WB	Anti-Maus IgG (200 µg/0,5 ml)	Santa Cruz (sc-2005)
anti-Kaninchen IgG-HRP	Ziege	1:5000 für WB	Anti-Kaninchen IgG (200 µg/0,5 ml)	Santa Cruz (sc-2004)

Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Immunglobuline

Name	Verwendung	Beschreibung	Hersteller
IgG Maus	3-5 µg/IP	Maus IgG (200 µg/0,5 ml)	Santa Cruz (sc-2025)
IgG Kaninchen	3-5 µg/IP	Kaninchen IgG (200 µg/0,5 ml)	Santa Cruz (sc-2027)
IgG Ziege	3-5 µg/IP	Ziege IgG (200 µg/0,5 ml)	Santa Cruz (sc-2028)

### 3.3. Molekularbiologische Methoden

#### 3.3.1. Standardmethoden

Molekularbiologische Methoden wurden nach den Protokollen von Sambrook *et al.* [195] durchgeführt. Dazu gehört die Anzucht von Bakterien, die Aufreinigung von Plasmid-DNA, die Modifikation von DNA mittels Restriktionsendonukleasen und Ligasen sowie Gelelektrophoresen und Polymerasekettenreaktionen. Eine Auflistung der verwendeten Kits u.a. zur Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien, Isolierung von RNA und genomischer DNA aus eukaryotischen Zellen und Aufreinigung von PCR-Fragmenten ist in Tabelle 6 gegeben.

Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Kits

Name des Kits	Anwendung	Hersteller
ChIP DNA Clean & Concentrator	Aufreinigung der ChIP-DNA	Zymo Research, Freiburg
GeneJET™ Gel Extraction Kit	Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	Fisher Scientific, Schwerte

Name des Kits	Anwendung	Hersteller
GeneJET™ Genomic DNA Purification Kit	Aufreinigung genomischer DNA aus eukaryotischen Zellen	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
GeneJET™ Plasmid Miniprep	Aufreinigung von Plasmid-DNA aus 3 ml Bakterienkulturen	Fisher Scientific, Schwerte
GeneJET™ PCR Purification Kit	Aufreinigung von PCR-Produkten	Fisher Scientific, Schwerte
Omniscript®-RT Kit	Umschreibung von RNA in cDNA	Qiagen, Hilden
PureLink™ HiPure Plasmid Filter Midiprep Kit	Aufreinigung von Plasmid-DNA aus 50-100 ml Bakterienkulturen	Life Technologies, Carlsbad
miRNeasy Mini Kit	Aufreinigung von miRNA und total RNA aus eukaryotischen Zellen	Qiagen, Hilden
miScript SYBR® Green PCR Kit	Nachweis und Quantifizierung von miRNA	Qiagen, Hilden

Restriktions- und modifizierende Enzyme wurden von Fisher Scientific (Schwerte) und New England Biolabs (Ipswich) bezogen.

### 3.3.2. Vektoren

#### 3.3.2.1. Expressionsvektor – pcDNA3.1-Flag

Im pcDNA3.1 Vektor befindet sich im Anschluss an den Promoter des humanen Cytomegalievirus (CMV) eine multiple Klonierungsstelle (*multiple cloning site*; MCS), die das Einbringen der Gensequenz ermöglicht. Der Vektor wurde dahingehend verändert, dass sich vor der MCS die Sequenz des Flag-Affinitätstags befindet, wodurch die Expression von Flag-Fusionsproteinen erreicht wird. Zur Amplifikation des Plasmids in Bakterien ist auf dem Vektor das Ampicillin-Resistenzgen vorhanden.

Zur Amplifikation der Sequenz des humanen *GATA1* wurde cDNA aus K562 Zellen benutzt und die verwendeten Primer sind nachfolgend aufgelistet.

Tabelle 7: Übersicht der verwendeten Primer zur Klonierung des humanen *GATA1* in den pcDNA3.1-Flag Vektor

Name	Enzym	Nukleotidsequenz 5'→3'
hGATA1 forw	<i>EcoRI</i>	CGATGAATTCACCATGGAGTTCCTGGCCT
hGATA1 rev	<i>XhoI</i>	CGATCTCGAGTCATGAGCTGAGCGG

#### 3.3.2.2. Lentiviraler Vektor pLeGO-iG2

Zur lentiviralen Transduktion von Gensequenzen in Säugerzellen wurde der pLeGO-iG2 Vektor verwendet. Dieser wurde von Prof. Dr. Boris Fehse (Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) zur Verfügung gestellt. Die Expression des Zielgens erfolgt über den Promoter des

*Spleen Focus-Forming Virus* (SFFV) und mittels der IRES-Sequenz wird das Grün fluoreszierende Protein (GFP) als Reportergen exprimiert. Die Selektion in Bakterien ermöglicht das Ampicillin-Resistenzgen auf dem Vektor.

Zur Amplifikation der Sequenz des humanen *GATA1* wurde der zuvor klonierte pcDNA3.1-Flag-GATA1 Vektor benutzt. Die cDNA-Sequenz von *RUNX1-ETO* und *RUNX1-ETOtr* wurde ebenfalls aus einem sich schon im Labor befindlichen pcDNA3-2HA-RUNX1-ETO Vektor amplifiziert. Die verwendeten Primer sind nachfolgend aufgelistet.

Tabelle 8: Übersicht der verwendeten Primer zur Klonierung des humanen *GATA1* sowie *RUNX1-ETO* und *RUNX1-ETOtr* in den pLeGO-iG2 Vektor

Name	Enzym	Nukleotidsequenz 5'→3'
hGATA1 forw	<i>EcoRI</i>	CGATGAATTCACCATGGAGTTCCTGGCCT
hGATA1 rev	<i>NotI</i>	CTATGCGGCCGCTCATGAGCTGAGC
RUNX1-ETO forw	<i>NotI</i>	ATATGCGGCCGCACCATGTACCCTTACGACGTGC
RUNX1-ETO rev	<i>NotI</i>	ATATGCGGCCGCCTAGCGAGGGGTTGTCTCTAT
RUNX1-ETOtr forw	<i>NotI</i>	ATATGCGGCCGCACCATGTACCCTTACGACGTGC
RUNX1-ETOtr rev	<i>NotI</i>	ATATGCGGCCGCCTAGCTGCTACTGCCGCCACC

### 3.3.2.3. Lentiviraler Vektor pLeGO-G2

Zur Überexpression genomischer miRNA-Sequenzen mittels lentiviraler Transduktion von Säugerzellen wurde der pLeGO-G2 Vektor verwendet. Dieser wurde ebenfalls von Prof. Dr. Boris Fehse (Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) zur Verfügung gestellt. Die Expression des Reportergens *GFP* erfolgt über den SFFV-Promoter. Die Anzucht in Bakterien ermöglicht das Ampicillin-Resistenzgen auf dem Vektor. Für die Expression des miR-144/451 Clusters wurde die genomische DNA aus K562 Zellen verwendet. Die genomische Sequenz des Clusters wurde mittels der Restriktionsenzyme *BsrGI* und *EcoRI* direkt im Anschluss an die *GFP*-Sequenz kloniert. Folgende Primer wurden verwendet.

Tabelle 9: Übersicht der verwendeten Primer zur Klonierung des humanen miR-144/451 Clusters in den pLeGO-G2 Vektor

Name	Enzym	Nukleotidsequenz 5'→3'
miR-144 forw	<i>BsrGI</i>	CGTGTACAAGTAACAAGCCATGCTTCCTGTGC
miR-451 rev	<i>EcoRI</i>	CAGAATTCGAGTCTCACTATGTTGTCTAGGCTGG

Nach erfolgreicher Klonierung des miR-144/451 Clusters wurden die *Seed*-Sequenzen der miR-144 und miR-451 einzeln oder doppelt mutiert. Hierfür wurden die folgenden Mutageneseprimer verwendet.

Tabelle 10: Übersicht der verwendeten Primer für die Mutagenese der *Seed*-Sequenz der miR-144 und miR-451

Name	Nukleotidsequenz 5'→3'
miR-144 seed mut forw	GGGCCCTGGCTGGGATATCATCATATTCAGAAAGTTTGCGATGAG
miR-144 seed mut rev	CTCATCGCAAACCTTTCTGAATATGATGATATCCCAGCCAGGGCCC
miR-451 seed mut forw	CACTTGGGAATGGCAAGGAATCGGATACCATTACTGAGTTTAGTA
miR-451 seed mut rev	TACTAAACTCAGTAATGGTATCCGATTCCTTGCCATTCCCAAGTG

### 3.3.2.4. Lentiviraler Vektor pSIEW

Der Vektor pSIEW ermöglicht durch lentivirale Transduktion das Einbringen von Gensequenzen in Säugerzellen. Der Vektor besitzt einen SFFV-Promotor und kodiert für das Reportergen *GFP*, welches unabhängig zur Zielsequenz über eine IRES-Sequenz exprimiert wird. Darüber hinaus verfügt der Vektor über das Ampicillin-Resistenzgen, welches die Selektion in Bakterien erlaubt.

Die verwendeten Plasmide, die im Labor vorhanden waren, kodieren für das humane *Tal1* und *RUNX1*.

### 3.3.2.5. Lentiviraler *Knockdown*-Vektor pSEW

Zur lentiviralen Transduktion von shRNAs in Säugerzellen wurde der pSEW Vektor benutzt. Dieser Vektor wurde in der Arbeitsgruppe so modifiziert, dass er für die Anzucht in Bakterien eine Ampicillin-Resistenz und zur Selektion in Säugerzellen eine Zeocin-Resistenz besitzt. Dieser Vektor verfügt über einen CMV-Promoter, der die Expression des *GFP*-Reportergens und der Zeocin-Resistenz steuert, sowie über einen RNA-Polymerase III-Promoter, der für die Expression der shRNA sorgt. Die folgenden shRNA-Sequenzen wurden bereits in der Arbeitsgruppe etabliert.

Tabelle 11: Übersicht der verwendeten shRNA-Sequenzen im pSEW Vektor

Name	Nukleotidsequenz 5'→3'
shLacZ Kontrolle	ACCTCGTGACCAGCGAATACCTGTTTCAAGAGAACAAAGAGGTATTCGCTGGTCACT
shTal1 #1	ACCTCGACAAGAACTAAGCAAGAATTCAAGAGATTCTTGCTTAGTTTCTTGCTTT
shRUNX1 #1	ACCTCGGCAGAACTAGATGATCAGATCAAGAGTCTGATCATCTAGTTTCTGCCTT
shRUNX1 #2	ACCTCGGCAGAACTATATGATCAGATCAAGAGTCTGATCATCTAGTTTCTGCCTT
shRUNX1-ETO#1	ACCTCACCTCGAAATCGTACTGAGAATCAAGAGTTCTCAGTACGATTTTCGAGGTTT
shRUNX1-ETO#2	ACCTCCCTCGAAATCGTACTGAGAAGTCAAGAGCTTCTCAGTACGATTTTCGAGGTT

### 3.3.2.6. Lentiviraler *Knockdown*-Vektor pGIPZ

Der *Knockdown*-Vektor pGIPZ (Open Biosystems) ermöglicht die lentivirale Transduktion von Säugerzellen und exprimiert unter der Kontrolle des CMV-Promoters das Markergen *GFP*, die

Puromycin-Resistenz zur Selektion in Säugerzellen sowie die shRNA. Zur Anzucht in Bakterien verfügt der Vektor über eine Ampicillin-Resistenz. Die folgenden shRNA-Konstrukte wurden bezogen.

Tabelle 12: Übersicht der verwendeten shRNA-Sequenzen im pGIPZ Vektor

Name	Bestellkodierung	reife <i>antisense</i> -Sequenz 5'→3'
shKontrolle	RHS4346	CTTACTCTCGCCCAAGCGAGA
shGATA1 #1	V3LHS_348336	TCATCTTGTGATAGAGGCC
shGATA1 #2	V3LHS_348337	AGCTTGTAAGTAGAGGCCGC
shTal1 #2	V3LHS_413460	ATCACTCTACTATCATTGT

### 3.3.2.7. Luciferase-Vektor pGL4.10

Der pGL4.10 Vektor kodiert für das Luciferasereporterogen *luc2* (*Photinus pyralis*) und besitzt keinen eigenen Promoter, sondern eine multiple Klonierungsstelle, die das Einfügen eines Promoters zur Steuerung des Luciferasegens ermöglicht. Zur Amplifikation des Plasmids in Bakterien ist auf dem Vektor das Ampicillin-Resistenzgen vorhanden. Der Promoter des miR-144/451 Clusters wurde bis 750 bp *upstream* der genomischen miR-144-Sequenz mit folgenden Primern in die MCS kloniert.

Tabelle 13: Übersicht der verwendeten Primer zur Klonierung des humanen miR-144/451 Promotors in den pGL4.10 Vektor

Name	Enzym	Nukleotidsequenz 5'→3'
miR-144/451 prom forw	<i>KpnI</i>	ATATGGTACCGCCAGGACCCTTCCTGCCCTAT
miR-144/451 prom rev	<i>HindIII</i>	TTGCCAAGCTTCCACTGGGGGCACAGGAAGCAT

### 3.3.2.8. Luciferase-Vektor pGL4.23

Der pGL4.23 Vektor besitzt einen Minimalpromotor *upstream* des Luciferasereporterogens *luc2* (*Photinus pyralis*), sodass die unabhängige Expression des Luciferasegens erfolgen kann. Dem Minimalpromotor kann eine *Enhancer*-Sequenz vorgeschaltet werden, die daraufhin in der Lage ist die Expression der Luciferase zu beeinflussen. Dies erfolgt über die multiple Klonierungsstelle. Zur Anzucht in Bakterien kodiert der Vektor für die Ampicillin-Resistenz. Folgende Primer wurden zur Klonierung der *Enhancer*-Sequenz des miR-144/451 Clusters verwendet. Der *Enhancer* umfasst den Bereich 3410 bp bis 4680 bp *upstream* der genomischen miR-144-Sequenz.

Tabelle 14: Übersicht der verwendeten Primer zur Klonierung des humanen miR-144/451 *Enhancers* in den pGL4.23 Vektor

Name	Enzym	Nukleotidsequenz 5'→3'
miR-144/451 enh forw	<i>KpnI</i>	CGATGGTACCGTCTGAACTCCTGGGTTCAA
miR-144/451 enh rev	<i>XhoI</i>	CGATCTCGAGCTACGCTGGGTGACAGAATG

### 3.3.3. Quantitative *real time* – PCR (qRT-PCR)

Die qRT-PCR dient zur Analyse der mRNA- bzw. miRNA-Expression. Hierfür wurde zunächst mit Hilfe des miRNeasy Mini Kits (Qiagen) die totale RNA isoliert sowie eine Fraktion angereicherter reifer miRNAs. Dies ermöglicht die Expressionsanalyse von Genen und prozessierten reifen miRNAs aus einer Probe. Die Umschreibung der RNA in cDNA zur Genexpressionsanalyse erfolgte mit dem Omniscript-RT Kit (Qiagen) mittels reverser Transkription. Für die Synthese der cDNA diente als Primer ein Hexanukleotid *Random*-Primer Mix (Carl Roth). Die qRT-PCR wurde anschließend mit dem LightCycler480 System (Roche) durchgeführt. Hierfür setzten sich die PCR-Ansätze wie folgt zusammen: 25 µl SYBR-Mix (MESA BLUE qPCR MasterMix Plus for SYBR® Assay, Eurogentec), 0,5 µl *forward*-Primer (10 pmol/µl), 0,5 µl *reverse*-Primer (10 pmol/µl), 22 µl H<sub>2</sub>O und 2 µl cDNA (15-50 ng/µl). Die Komponenten wurden vermischt und zur Doppelbestimmung zwei Mal 24 µl des qRT-PCR-Ansatzes in eine 96 *Well*-Platte (4titude) überführt.

Tabelle 15: qRT-PCR Programm zur Quantifizierung der cDNA

Programmschritt	Temperatur [°C]	Zeit	Zyklen
Aktivierung der Polymerase	95	10 min	1x
Denaturierung	95	30 sec	
Primer-Anlagerung	58	30 sec	50x
DNA-Synthese	72	30 sec	
Messung	78	1 sec	1x
Schmelzkurve	60 – 97	Messung in 5°C Schritten	1x

Zur Berechnung der mRNA-Expression wurde die  $\Delta\Delta CT$ -Methode herangezogen [196]. Die Normalisierung der Expression erfolgte auf die Referenzgene *Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase* (*GAPDH*) und *TATA-Box-Bindeprotein* (*TBP*). Als Bezugspunkt für die Berechnung der relativen mRNA-Expression dienten Messungen der jeweiligen Kontrollzellen, deren Wert auf 1 gesetzt wurde. Im Folgenden sind die verwendeten humanen Primer aufgelistet.

Tabelle 16: Übersicht der verwendeten Primer zur Messung der cDNA

Name	Nukleotidsequenz 5'→3'
α-Globin forw	CAAGACCAACGTCAAGGCCG
α-Globin rev	TTAACCTGGGCAGAGCCGTG
β-Globin forw	CCACTCCTGATGCTGTTATG
β-Globin rev	CAGGAGCCTGAAGTTCTCAG
CD41 forw	AATGGCCCCTGCTGTCGTGC
CD41 rev	TGCACGGCCAGCTCTGCTTC
CD71 forw	AGGACGCGCTAGTGTTCCTC
CD71 rev	CCAGGCTGAACCGGGTATATG
GAPDH forw	TCTTTTGCGTCGCCAGCCGAGC
GAPDH rev	TGACCAGGCGCCCAATACGACC
GATA 1 forw	GACACTCCCCAGTCTTTCAGG
GATA1 rev	CAGTTGAGGCAGGGTAGAGC
GpA forw	CCCTCCAGAAGAGGAAACCGGAGA
GpA rev	GGCACGTCTGTGTCTAGGTGAGG
EPOR forw	ATCCTGGAGGGCCGCACCGA
EPOR rev	AGGGGGTCCAGGTCGCTAGGC
miR-144/451 forw	GATGTACTAGTCCGGGCACCCCC
miR-144/451 rev	GTGCCCTGGCAGTCAGTAGGTTG
RUNX1 forw	TCGACTCTCAACGGCACCCGA
RUNX1 rev	TGACCGGCGTCGGGGAGTAG
RUNX1-ETO forw	AAAAGCTTCACTCTGACCAT
RUNX1-ETO rev	TAGTTAACGTTGTCTGGTGTA
Tal1 forw	TCGGCAGCGGGTTCTTTGGG
Tal1 rev	CCATCGCTCCCGGCTGTTGG
TBP forw	TTCGGAGAGTTCTGGGATTGTA
TBP rev	TGGA CTGTTCTTCACTCTTGGC

Zur Quantifizierung der reifen miRNA wurde sowohl das miScript-System (Qiagen) als auch das TaqMan-System von Life Technologies verwendet. Für das miScript-System wurden 300 ng RNA aus der miRNA angereicherten Fraktion mit dem miScript II RT Kit (Qiagen) umgeschrieben. Die cDNA wurde anschließend verdünnt, sodass 3 ng pro qRT-PCR-Reaktion eingesetzt werden konnten. Die qRT-PCR wurde an dem LightCycler480 (Roche) durchgeführt und hierbei das miScript SYBR® Green PCR Kit (Qiagen) verwendet. Das PCR-Programm bestand aus folgenden Schritten.

Tabelle 17: qRT-PCR Programm zur Quantifizierung der miRNA

Programmschritt	Temperatur [°C]	Zeit	Zyklen
Aktivierung der Polymerase	95	15 min	1x
Denaturierung	94	15 sec	45x

Programmschritt	Temperatur [°C]	Zeit	Zyklen
Primer-Anlagerung	55	30 sec	
DNA-Synthese	70	30 sec	
Messung	78	1 sec	1x
Schmelzkurve	60 – 97	Messung in 5°C Schritten	1x

Die Berechnung erfolgte ebenfalls nach der  $\Delta\Delta CT$ -Methode und als Referenzgene dienten *SNORD68* sowie *RNU6-2* [196]. Folgende Primer wurden zur Analyse von Qiagen verwendet.

Tabelle 18: Übersicht der verwendeten Primer zur Messung der miRNA

Name	Bestellkodierung
hsa-RNU6-2	MS00033740
hsa-SNORD68	MS00033712
hsa-miR-144-3p	MS00020328
hsa-miR-451a	MS00004242
hsa-miR-126-3p	MS00003430
hsa-miR-27a-3p	MS00003241
hsa-miR-223-3p	MS00003871
hsa-miR-28-3p	MS00009254
hsa-miR-222-3p	MS00007609
hsa-miR-221-3p	MS00003857
hsa-miR-146-5p	MS00003535
hsa-miR-150-5p	MS00003577
hsa-miR-34a-5p	MS00003318

Für die Quantifizierung der reifen miRNA mit dem TaqMan-System (Life Technologies) wurden 50-100 ng RNA spezifisch mit einer Primermischung aus den gewünschten Primern durch die reverse Transkriptase umgeschrieben. Dabei wurden folgende TaqMan-Sonden verwendet.

Tabelle 19: Übersicht der verwendeten TaqMan-Sonden zur Messung der miRNA

Name	Bestellkodierung
hsa-RNU6B	001093
hsa-RNU48	001006
hsa-miR-144-3p	197375_mat
hsa-miR-451a	001141

Die reverse Transkription erfolgte nach dem folgenden Programm.

Tabelle 20: PCR-Programm der reversen Transkription

Temperatur [°C]	Zeit
16	30 min



Temperatur [°C]	Zeit
42	30 min
85	5 min
4	∞

Zur Analyse der Proben mittels qRT-PCR wurden diese anschließend 1:1 verdünnt und zusammen mit weiteren Komponenten vermischt. Die Messung an dem LightCycler480 (Roche) erfolgte in einer 96 *Well*-Platte und in Triplikaten. Die folgenden PCR-Parameter wurden eingestellt.

Tabelle 21: qRT-PCR Programm zur Quantifizierung der miRNA mittels TaqMan

Programmschritt	Temperatur [°C]	Zeit	Zyklen
Aktivierung der Polymerase	95	10 min	1x
Denaturierung	95	15 sec	40x
Anlagerung & Synthese	60	60 sec	

Die anschließende Berechnung der relativen miRNA-Expression erfolgte nach der  $\Delta\Delta CT$ -Methode unter Normalisierung der Ergebnisse auf die Referenzgene und als Bezugspunkte fungierten Messungen mit den jeweiligen Kontrollzellen [196].

Zur Quantifizierung von Chromatin-Immunopräzipitations-DNA (ChIP) wurden 2-3  $\mu$ l des Chromatins für eine Doppel- bzw. Dreifachbestimmung verwendet. Die qRT-PCR wurde an dem LightCycler480 (Roche) durchgeführt und die PCR-Ansätze setzten sich wie folgt zusammen: 25  $\mu$ l SYBR-Mix (MESA BLUE qPCR MasterMix Plus for SYBR® Assay, Eurogentec), 0,5  $\mu$ l *forward*-Primer (10 pmol/ $\mu$ l), 0,5  $\mu$ l *reverse*-Primer (10 pmol/ $\mu$ l), 21-22  $\mu$ l H<sub>2</sub>O und 2-3  $\mu$ l Chromatin. Die Komponenten wurden vermischt und in eine 96 *Well*-Platte überführt. Das PCR-Programm wurde wie folgt gewählt.

Tabelle 22: qRT-PCR Programm zur Quantifizierung der ChIP-DNA

Programmschritt	Temperatur [°C]	Zeit	Zyklen
Aktivierung der Polymerase	95	5 min	1x
Denaturierung	95	20 sec	50-60x
Primer-Anlagerung	60	20 sec	
DNA-Synthese	72	20 sec	
Messung	78	1 sec	1x
Schmelzkurve	60 – 95	Messung in 5°C Schritten	1x

Eine Übersicht der verwendeten Primer findet sich in der Tabelle 23.

Tabelle 23: Übersicht der verwendeten Primer zur Messung der ChIP-DNA

Name	Nukleotidsequenz 5'→3'
Chromosom 18 forw	ACTCCCCTTTTCATGCTTCTG
Chromosom 18 rev	AGGTCCCAGGACATATCCATT
GAPDH Promoter forw	GCTACTAGCGGTTTTACGGGCG
GAPDH Promoter rev	TGCGGCTGACTGTGCAACAGG
GpA Promoter forw	CAGGCGCTTAACAACCTTGCATCA
GpA Promoter rev	CATACATCCTGAGATCATGAGCTG
miR-144/451 Promoter 1 forw	CCTGGGCTGTGCCTGACCAC
miR-144/451 Promoter 1 rev	AGCACTGTGAGGGGCTGGGG
miR-144/451 Promoter 2 forw	CCGGTATGATAAAAGGCAAGCAG
miR-144/451 Promoter 2 rev	AAGGTTCCCTTTGGTCACACTAA
miR-144/451 Promoter 3 forw	GTGAGAAAAGGCCTTCTAGGGAA
miR-144/451 Promoter 3 rev	CTTTTATCATACCGGTCCCTCCC
miR-144/451 Enhancer 1 forw	CTTCCTGTTCTCTGAGTCATGC
miR-144/451 Enhancer 1 rev	GAGAACTGAAGGCAGAGAGGAG
miR-144/451 Enhancer 2 forw	GGCTCCTGATAAACAGAAGGCTG
miR-144/451 Enhancer 2 rev	GGATTGCTGTGAGTAGGGTGTG
miR-144/451 Enhancer 3 forw	CTGTCTGTGGGTTTCTGAGTAG
miR-144/451 Enhancer 3 rev	GTGAGGCATTGTCGTTATGTCTG
miR-144/451 negativ Kontrolle forw	GTGTTACTTCTGCAGGGAAGTCT
miR-144/451 negativ Kontrolle rev	TGAATAACAAGGCCCTCATGACT
OGG1 Promoter forw	AACCACCGCTCATTTACCTAGA
OGG1 Promoter rev	CCCACCCTGATTCTCATTGGC

Mittels der gemessenen Ct-Werte konnte die Anreicherung bezogen auf den *Input* mit folgender Formel berechnet werden:  $100 \cdot 2^{(Ct_{100\% \text{ Input}} - Ct_{\text{ChIP-IP}})}$ .

### 3.3.4. miRNA-Sequenzierung

Zur Bestimmung differentiell exprimierter miRNAs wurden RNA-Proben im Transkriptom-analyselabor in Göttingen untersucht. Hierfür wurden K562 Zellen in biologischen Triplikaten mit den lentiviralen Überexpressionsvektoren pSIEW und pSIEW-RUNX1 transduziert. Die totale RNA wurde mit Hilfe des „miRNeasy Mini Kits“ isoliert und anschließend mit DNase I (Sigma) behandelt, um eine Kontamination mit DNA zu vermeiden. Zur Erstellung der RNA-Bibliothek wurde das „TruSeq Small RNA Sample Preparation Kit“ (Illumina; catalog RS-200-0012) verwendet. Die exakte Quantifizierung der cDNA-Bibliotheken wurde mit dem QuantiFluor™ dsDNA System (Promega) durchgeführt, anschließend wurden diese amplifiziert und sequenziert mittels „cBot and HiSeq 2000“ (Illumina SR, 1x51 bp, 4 GB pro Probe). Die Sequenzierungsdaten konnten mit der Illumina Software BaseCaller zu bcl-Dateien umgewandelt werden, die wiederum die fastq-Dateien durch das Programm CASAVA

---

(Version 1.8.2) ergaben. Eine Qualitätsprüfung erfolgte mit FastQC (Version 0.10.1, Babraham Bioinformatics) und unterschiedlich exprimierte kleine RNA-Moleküle konnten mit Hilfe der OASIS Plattform (Pubmed ID 25701573) identifiziert werden.

### 3.3.5. Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)

Mittels Chromatin-Immunopräzipitation kann die Interaktion von Proteinen mit der DNA analysiert werden. Hierfür wurden  $5 \cdot 10^6$  bis  $1 \cdot 10^7$  Zellen geerntet und in 10 ml RPMI-Medium resuspendiert. Durch die Zugabe von 0,75 % (v/v) Formaldehyd für 15 min bei Raumtemperatur wurden die Protein-DNA-Komplexe kovalent miteinander verbunden. Diese Reaktion wurde durch die Zugabe von 125 mM Glycin für 5 min bei Raumtemperatur gestoppt. Die Zellen wurden anschließend drei Mal mit kaltem PBS gewaschen und final bei 4°C und 1200 g für 5 min pelletiert. Das Pellet wurde in 600 µl bzw. 1200 µl ChIP-Lyse-Puffer mit Proteaseinhibitor resuspendiert und für 45 min auf Eis inkubiert. Zur Fragmentierung der DNA in ca. 1000 Basenpaar große Stücke, wurde das Lysat mit dem Ultraschallgerät Bioruptor (Diagenode) sonifiziert. Zur Abtrennung der Zelltrümmer wurde die Probe für 4 min bei 4°C und 8000 g zentrifugiert. Das Chromatin im Überstand wurde sofort verwendet oder aber aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Für die Immunopräzipitationen wurden zunächst Protein G-*Beads* (Life Technologies) vorbereitet. Hierfür wurden 50 µl *Beads* mit RIPA-Puffer gewaschen und anschließend mit 100 ng Lachssperma DNA pro µl *Beads* für 30 min bei 4°C inkubiert. In einem weiteren Inkubationsschritt erfolgte die Blockierung mit Roti-Block für 45 min bei 4°C. Die blockierten *Beads* wurden anschließend in 300 µl RIPA-Puffer aufgenommen. Die Ansätze der ChIPs setzten sich wie folgt zusammen: 25 µg Chromatin, 20 µl *Beads*, 3-5 µg Antikörper und Proteaseinhibitor. Mit RIPA-Puffer wurden die Ansätze auf eine Konzentration von 0,1 % SDS aufgefüllt. Die Proben wurden bei 4°C unter kontinuierlicher Rotation über Nacht inkubiert. Für die Input-Probe wurden 25 µg Chromatin versetzt mit Proteaseinhibitor bei 4 °C gelagert. Am nächsten Tag wurden die magnetischen *Beads* mit Hilfe von magnetischen Ständern drei Mal mit dem Waschpuffer 1 und anschließend mit dem Waschpuffer 2 für jeweils 10 min bei 4°C unter kontinuierlicher Rotation gewaschen. Beim Wechseln des Waschpuffers wurde ebenfalls das Reaktionsgefäß gewechselt. Anschließend wurden die *Beads* in 120 µl Elutionspuffer resuspendiert und für 30 min bei 30°C und 1000 rpm inkubiert. Hierdurch lösten sich die Protein-DNA-Komplexe von den *Beads*. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 5 µl Proteinase K versetzt. Ab hier wurden die Input-Proben mitgeführt. Dafür wurde das Volumen mit Elutionspuffer auf 120 µl aufgefüllt und ebenfalls 5 µl Proteinase K hinzugegeben. Die Proteinase K baute im nachfolgenden Schritt die Proteine ab, sodass die

zuvor stabilisierten DNA-Protein-Komplexe zerfielen. Hierfür erfolgte eine Inkubation der Proben bei 65°C für 5 Stunden. Das Chromatin wurde abschließend mit Hilfe des „ChIP DNA Clean & Concentrator Kits“ (Zymo Research) aufgereinigt und in 40 µl eluiert.

Tabelle 24: Zusammensetzung der verwendeten Puffer für ChIP

Name	Zusammensetzung
1xPBS	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1,7 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
ChIP-Lyse-Puffer	50 mM HEPES-KOH pH 7,5; 140 mM NaCl; 1 mM EDTA pH 8,0; 1 % Triton-X-100, 1 % Natrium-Deoxycholat; 0,4 % SDS
RIPA-Puffer	50 mM Tris-HCl pH 8; 150 mM NaCl; 2 mM EDTA pH 8,0; 1 % NP-40; 0,5 % Natrium-Deoxycholat
Waschpuffer 1	0,1 % SDS; 1 % Triton-X-100; 2 mM EDTA pH 8; 150 mM NaCl; 20 mM Tris-HCl pH 8
Waschpuffer 2	0,1 % SDS; 1 % Triton-X-100; 2 mM EDTA pH 8; 500 mM NaCl; 20 mM Tris-HCl pH 8
Elutionspuffer	1 % SDS; 100 mM NaHCO <sub>3</sub>
SDS	1 mg/ml in H <sub>2</sub> O

### 3.3.6. Gesamtzellextrakten

Zur Herstellung von Gesamtzellextrakten wurden die Zellen nach dem Ernten und Pelletieren mit PBS gewaschen und 350 µl RIPA-Puffer versetzt. Proteaseinhibitor wurde hinzugefügt und nachdem die Zellen für 5 min auf Eis inkubierten, wurde 2 µl NP-40 zugegeben und die Probe gut gemischt. Nach einer Inkubation von 20 min auf Eis wurden die Proben für 10 min bei 4°C sowie 15000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde aliquotiert, 1:4 mit Proteinladepuffer versetzt und anschließend direkt verwendet werden.

Tabelle 25: Zusammensetzung der verwendeten Puffer zur Herstellung von Gesamtzellextrakten

Name	Zusammensetzung
1xPBS	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1,7 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
RIPA-Puffer	50 mM Tris-HCl pH 8; 150 mM NaCl; 2 mM EDTA pH 8,0; 1 % NP-40; 0,5 % Natrium-Deoxycholat
20% NP-40	2 ml NP-40 in 10 ml H <sub>2</sub> O
4x Protein-Ladepuffer	500 mM Tris pH 6,8; 4 % SDS; 30 % Glycerol; 40 mM DTT; Bromphenolblau

### 3.3.7. Luciferase Assay

Für den Luciferase Assay wurden die Hek293T und K562 Zellen 48 Stunden nach der Transfektion geerntet und mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit 90 µl Luciferase-Lysepuffer für 15 min auf Eis lysiert. Die Zelltrümmer wurden anschließend runter zentrifugiert und 10 µl des Lysats wurde in eine 96-Well-Platte pipettiert. Durch die Zugabe des Luciferase-

Puffers katalysiert die Luciferase die Oxidation des Luciferins, wobei Licht emittiert wird. Dieses wird im Luminometer Microlumat LB96P bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen. Die Messung des Luciferase-Lysepuffers dient hierbei als Basalwert der gesamten Messung.

Tabelle 26: Zusammensetzung der verwendeten Puffer für Luciferase Assay

Name	Zusammensetzung
Luciferase-Lysepuffer	50 mM Tris pH 7,4; 1 % Triton X-100; 50 mM NaCl
Luciferase-Puffer	21,625 mM Glycylglycin; 1 mM ATP; 10 mM MgSO <sub>4</sub> ; 0,075 mM Luciferin

Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurde ein Vektor co-transfiziert, der für die  $\beta$ -Galaktosidase kodiert. Dies ermöglicht die Normalisierung der Luciferasewerte bezüglich der einzelnen Transfektionseffizienzen. Zur Aktivitätsmessung der  $\beta$ -Galaktosidase wurden 10  $\mu$ l des Lysats in eine 96 Well-Platte pipettiert und mit 100  $\mu$ l  $\beta$ -Galaktosidasepuffer versetzt. Die Messung der Gelbfärbung, die aus der Hydrolyse des *o*-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid (ONPG) zu Galaktose und ortho-Nitrophenol resultierte, erfolgte mit dem SPECTRAMax™340 (Molecular Devices, Sunnyvale) und dem Programm SPF SoftMaxPro bei einer Wellenlänge von 420 nm.

Tabelle 27: Zusammensetzung der verwendeten Puffer für  $\beta$ -Galaktosidase Assay

Name	Zusammensetzung
$\beta$ -Galaktosidasepuffer	11,1 mM MgCl <sub>2</sub> ; 50 mM $\beta$ -Mercaptoethanol; 3,25 mM ONPG; 74,4 mM Natrium-Phosphat pH 7,5
Natrium-Phosphat-Lösung (100 mM)	82 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O; 18 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O
ONPG	13,28 mM in 100 mM Natrium-Phosphat-Lösung

### 3.4. Zellbiologische Methoden

#### 3.4.1. Zelllinien

Tabelle 28: Übersicht der verwendeten Zelllinien

Name	Zelltyp	Medium
Hek293T	humane embryonale Nierenzellen	DMEM
K562	humane Leukämiezelllinie aus einem CML-Patienten	RPMI
TF-1	humane Erythroleukämie-Zelllinie	RPMI
Kasumi-1	akute myeloische Leukämie-Zelllinie (AML FAB M2)	RPMI
CD34	humane Stammzellen positiv für CD34, isoliert aus dem peripheren Blut von Spendern	SFEM mit Zytokinen versetzt

---

### **3.4.2. Kultivierung humaner Zelllinien**

Die in der Tabelle 28 aufgelisteten Zelllinien wurden im Brutschrank bei 37°C, 95 % relativer Luftfeuchtigkeit und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Das DMEM- bzw. RPMI-Medium der Hek293T bzw. K562 Zellen wurde mit 1 % Penicillin/Streptomycin, 2 mM L-Glutamin sowie 10 % fötalem Kälberserum versetzt. Dem RPMI-Medium der TF-1 und Kasumi-1 Zellen wurde 20 % fötalem Kälberserum, 1 % Penicillin/Streptomycin und 2 mM L-Glutamin beigelegt und die TF-1 Zellen benötigten zusätzlich 2 ng/ml GM-CSF zur Kultivierung.

### **3.4.3. Einfrieren und Auftauen humaner Zelllinien**

3\*10<sup>6</sup> Zellen wurden in 1 ml fötalem Kälberserum mit 10 % DMSO langsam in einer mit Isopropanol gefüllten Einfrierbox abgekühlt. Anschließend wurden die Zellen bei -80°C bzw. im flüssigen Stickstoff gelagert.

Zellen, die in Kultur genommen werden sollten, wurden schnell bei 37°C aufgetaut und in das jeweilige Medium überführt. Nach 24 Stunden wurde das Medium vollständig ausgetauscht.

### **3.4.4. Differenzierung humaner Zelllinien in Richtung Erythrozyten und Megakaryozyten**

Für die Differenzierung von K562 Zellen in Richtung Erythrozyten bzw. Megakaryozyten wurden 2\*10<sup>6</sup> Zellen in einer 10 cm-Schale ausgesät. Für die Megakaryozytendifferenzierung wurde dem Kultivierungsmedium 30 nM TPA (*12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate*) zugelegt und für die Induktion der erythroiden Differenzierung wurden die Zellen mit 30 µM Hemin inkubiert.

### **3.4.5. Isolierung humaner hämatopoetischer Stammzellen aus peripherem Blut**

Die durch G-CSF mobilisierten hämatopoetischen Stammzellen von gesunden Spendern wurden apheretisch isoliert und freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Bönig, Blutspendedienst Frankfurt zur Verfügung gestellt. Die peripheren mononukleären Zellen wurden zunächst von den Lymphozyten und Monozyten durch Dichtegradienten-Zentrifugation mittels Ficoll abgetrennt [197]. Unter Verwendung des „CD34 Microbead Kits“ (Milenyi Biotec) wurden die CD34+ Zellen durch positive Selektion anschließend nach Angaben des Herstellers isoliert. Die isolierten CD34+ Zellen wurden auf ihre Reinheit mittels Durchflusszytometrie (FACS = *fluorescence-activated cell sorting*) hin untersucht. CD34+ Zellen, die nicht sofort verwendet wurden, wurden in dem „CryoStor CS10 Medium“ (Stemcell Technologies) resuspendiert und bei -80°C gelagert.

### 3.4.6. Kultivierung primärer humaner hämatopoetischer Stammzellen

hCD34<sup>+</sup> Zellen wurden in Serum freiem Medium (Stemcell Technologies) unter Zugabe von Zytokinen in einer Zelldichte von  $5 \cdot 10^5$  Zellen/ml Medium expandiert. Das Medium setzte sich wie folgt zusammen [198].

Tabelle 29: Zusammensetzung des Expansionsmediums humaner CD34<sup>+</sup> Zellen

Bezeichnung	Konzentration
rekombinanter humaner Stammzellfaktor (SCF)	100 ng/ml
rekombinanter humaner Flt3-Ligand	100 ng/ml
humanes Interleukin-3 (IL-3)	20 ng/ml
humanes Interleukin-6 (IL-6)	20 ng/ml

### 3.4.7. Differenzierung humaner CD34<sup>+</sup> Zellen zu Erythrozyten und Megakaryozyten

Die Differenzierung von hCD34<sup>+</sup> Zellen zu Erythrozyten bzw. Monozyten erfolgte in speziellem Differenzierungsmedium über einen Zeitraum von 9 bis 12 Tage. Der Differenzierungsstatus wurde mittels Durchflusszytometrie kontrolliert. Hierfür wurden die Expression der Oberflächenmarker Glycophorin A (GYPA) und CD71 für die erythroide Differenzierung und CD41 für die megakaryozytäre Differenzierung gemessen. Für das Erythrozyten-Differenzierungsmedium wurde das Serum freie Medium II (Stemcell Technologies) mit folgenden Zusätzen versetzt [198].

Tabelle 30: Zusammensetzung des Differenzierungsmediums humaner CD34<sup>+</sup> Zellen zu Erythrozyten

Bezeichnung	Konzentration
rekombinanter humaner Stammzellfaktor (SCF)	20 ng/ml
humanes Interleukin-3 (IL-3)	5 ng/ml
Erythropoietin (EPO)	3 U/ml
Dexamethason	2 $\mu$ M
Estradiol	0,2 $\mu$ M

Das megakaryozytäre Differenzierungsmedium bestand ebenfalls aus dem Serum freien Medium II (Stemcell Technologies) und wurde mit dem Zytokincocktail „StemSpan Megakaryozyten Expansionsmix“ (Stemcell Technologies) versetzt.

Die Differenzierung von hCD34<sup>+</sup> Zellen in Richtung der megakaryozytären-erythroiden Vorläuferzellen (MEP = *Megakaryocyte-erythroid progenitor*) erfolgte in einem kombinierten Differenzierungsmedium [199]. Dieses bestand neben dem Serum freien Medium II (Stemcell Technologies) aus folgenden Zusätzen.

Tabelle 31: Zusammensetzung des Differenzierungsmediums humaner CD34+ Zellen zu Erythrozyten-Megakaryozyten-Vorläuferzellen

Bezeichnung	Konzentration
rekombinanter humaner Stammzellfaktor (SCF)	100 ng/ml
humanes Interleukin-3 (IL-3)	10 ng/ml
Erythropoietin (EPO)	0,5 – 3 U/ml
humanes Interleukin-6 (IL-6)	10 ng/ml
Thrombopoietin (TPO)	50 ng/ml
L-Glutamin	2 mM

Nach 7 Tagen wurde die Konzentration des Erythropoietin von 0,5 U/ml auf 3 U/ml erhöht und nach 10 Tagen erfolgte die Ernte der Zellen.

### 3.4.8. Koloniebildende Wachstumsversuche mit dem humanen *Colony Formation Units – Assay* (CFU – Assay)

Mit Hilfe des CFU-Assays konnte die Differenzierung von hCD34+ Zellen, die durch Transduktion modifiziert wurden, analysiert werden. Hierfür wurden die hCD34+ Zellen nach einer dreitägigen Kultivierung in Expansionsmedium lentiviral transduziert. Die erfolgreich transduzierten hCD34+ Zellen wurden anhand ihres GFP-Signals am FACS Aria (BD Biosciences, Heidelberg) sortiert. Anschließend wurden die Zellen für zwei weitere Tage in Expansionsmedium kultiviert, bevor diese in das Methylcellulose-Medium (StemMACS HSC-CFU mit Epo, human) überführt wurden.  $1 \cdot 10^4$  sortierte hCD34+ Zellen wurden in 300  $\mu$ l SFEM-Medium versetzt mit 3 % Penicillin/Streptomycin aufgenommen und zu 3 ml des zähflüssigen Methylcellulose-Mediums gegeben. Nach intensiven Mischens wurden jeweils 1,4 ml des Mediums in eine 35 mm große Zellkulturschale überführt. Das Medium ist mit folgenden Zytokinen versetzt: rekombinanter humaner Stammzellfaktor (SCF), humanes Interleukin-3 (IL-3), humanes Interleukin-6 (IL-6), Erythropoietin (EPO), Granulozyten Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF), Granulozyten Kolonie-stimulierender Faktor (G-CSF). Diese Zytokinzusammensetzung ermöglicht den hCD34+ Zellen zu proliferieren und in verschiedene Zelltypen zu differenzieren. Die hohe Viskosität des Methylcellulose-Mediums führt dabei zur Ausbildung abgegrenzter Kolonien, da sich die Zellen nicht frei im Medium verteilen können. Nach 12 Tagen erfolgte die Zuordnung der Kolonien durch mikroskopische Analysen.

### 3.4.9. Herstellung lentiviraler Partikel

Zur Herstellung der lentiviralen Partikel wurden  $1,4 \cdot 10^7$  Hek293T Zellen in einer T175 Zellkulturflasche ausgesät. Nach 24 Stunden erfolgte die Transfektion mit folgendem Ansatz:



28,8 µg lentivirales Plasmid (pLeGO-G2, pLeGO-iG2, pSEW, pSIEW, pGIPZ), 10,1 µg Hüllproteinplasmid (pMDG2-VSV-G), 18,7 µg Verpackungsplasmid (pCMVdelta8\_91/M334) und 144 µg Transfektionsreagenz Polyethylenimin (1 mg/ml) in 430 µl DMEM ohne Zusätze. Die Ansätze wurden gemischt, für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend auf die Hek293T Zellen gegeben. Nach 24 Stunden erfolgte ein Mediumswechsel und nach weiteren 48 bis 96 Stunden wurde der Virusüberstand gesammelt und bei 4°C gelagert.

#### 3.4.10. Ultrazentrifugation lentiviraler Partikel

Durch das Aufkonzentrieren der Viruspartikel konnte die Transduktionseffizienz effektiv gesteigert werden. Hierfür wurde der gesammelte Virusüberstand zunächst durch Zentrifugation für 5 min bei 1500 rpm von Zellresten getrennt und anschließend mit Hilfe eines 22 µm Filters steril filtriert. Der Überstand wurde in Zentrifugationsröhrchen (BD Biosciences #326823, Heidelberg) überführt und mit einer 20 %-igen Saccharoselösung unterschichtet. Für zwei Stunden bei 25000 rpm und 4°C erfolgte die Ultrazentrifugation in einer BD L8-60M Zentrifuge mit dem Rotoreinsatz SW-Ti 32. Anschließend wurde der Überstand vollständig entfernt und die Viruspartikel in sterilem PBS resuspendiert. Bis zur Verwendung wurden die Viruspartikel bei -80°C gelagert.

Tabelle 32: Zusammensetzung der verwendeten Puffer für die Ultrazentrifugation lentiviraler Partikel

Name	Zusammensetzung
20%-ige Saccharoselösung	200 g D(+)-Saccharose in 1 l H <sub>2</sub> O, steril
1xPBS	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1,7 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>

#### 3.4.11. Transduktion humaner hämatopoetischer Zellen

Für die Transduktion der Zelllinien K562 bzw. TF-1 wurden  $1,4 \cdot 10^6$  Zellen in 3 ml Kultivierungsmedium aufgenommen und in ein Loch einer 6 Well-Platte überführt. Dem Medium wurden 12 µg Protaminsulfat und 200 µl des konzentrierten Virus beigelegt. Die Platte wurde anschließend bei 30°C und 2000 rpm für 60 min zentrifugiert. Nach vier Stunden wurden die Zellen mit zusätzlich 2 ml frischen Medium versorgt. Am darauffolgenden Tag erfolgte die zweite Transduktion nach identischen Prozedere. 12 bis 24 Stunden nach der letzten Transduktion wurden die Zellen pelletiert und in virusfreies Kultivierungsmedium überführt.

Für die Transduktion der hämatopoetischen Stammzellen hCD34+ wurden  $5 \cdot 10^6$  Zellen in 1 ml Expansionsmedium aufgenommen und in ein Loch einer 24 Well-Platte ausgesät. Anschließend wurden 200 µl Virus und 3,2 µg Protaminsulfat (400 µg/ml) auf die Zellen gegeben. Die Platte wurde ebenfalls bei 30°C und 2000 rpm für 60 min zentrifugiert. Am

---

darauffolgenden Tag erfolgte entweder die zweite Transduktion oder die hCD34+ Zellen wurden pelletiert und nachfolgend in das jeweilige Expansions- bzw. Differenzierungsmedium überführt.

#### **3.4.12. Transiente Transfektion humaner Zelllinien**

Die transiente Transfektion konnte zur Herstellung von Gesamtzellextrakten verwendet werden. Hierfür wurden  $2 \cdot 10^6$  Hek293T Zellen in eine 10 cm Kulturschale in 10 ml Medium ausgesät. Nach 24 Stunden erfolgte die Transfektion mit folgendem Ansatz: 2 µg Plasmid und 18 µg Polyethylenimin (1 mg/ml) in 200 µl DMEM ohne Zusätze. Vier Stunden nach der Transfektion wurde das Medium gewechselt.

Für den Luciferase Assay wurden  $9 \cdot 10^4$  Hek293T bzw.  $2,5 \cdot 10^5$  K562 Zellen pro 500 µl in 24-Well-Platten zur Transfektion ausgesät. Nach 24 Stunden wurden folgende Ansätze auf die Zellen pipettiert: 75 µl DMEM bzw. RPMI-Medium ohne Zusätze, 3 µl Transfektionsreagenz Metafectene, 250 ng  $\beta$ -Galactosidase-Plasmid, 250 ng Promotor- bzw. *Enhancer*-Plasmid und 500 ng Plasmid der Transkriptionsfaktoren.

#### **3.4.13. FACS-Analyse (fluorescence activated cell sorting)**

Mit Hilfe der FACS-Analyse kann die Exposition von Oberflächenproteinen ermittelt werden. Hierfür wurden humane Zellen mit den entsprechenden Antikörpern, die einen konjugierten Farbstoff besaßen, inkubiert und anschließend im FACSCanto (BD Biosciences, Heidelberg) unter Verwendung der FACSDiva Software (BD Biosciences, Heidelberg) analysiert. Für die Färbung wurden  $2 \cdot 10^5$  Zellen mit PBS gewaschen und anschließend für 10 min mit dem FcR Blockierungsreagenz (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) bei 4°C inkubiert. Hierdurch sollten unspezifische Bindungen an Fc-Rezeptoren verhindert werden. Die Zellen wurden nachfolgend zwei Mal mit PBS gewaschen und mit dem jeweiligen Antikörper für 20 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Final wurden die Zellen zwei Mal gewaschen mit PBS und in 250 µl PBS aufgenommen. Anschließend konnte die Analyse mittels FACS erfolgen.

Folgende Antikörper wurden von der Firma Miltenyi Biotec bezogen: CD34-APC zur Untersuchung des Stammzellcharakters, CD235a (GPYA)-APC und CD71-APC zur Analyse der erythroiden Differenzierung und CD42b-APC zur Untersuchung der Megakaryozyten-Differenzierung. Für letzteres wurde ebenfalls ein CD41-APC Antikörper der Firma BioLegend (Fell) verwendet.

---

## 4. Zielsetzung

Während der Hämatopoese entstehen aus pluripotenten Stammzellen reife Erythrozyten, die für den Sauerstofftransport essentiell sind [20, 21]. Die Regulation des Differenzierungsprozesses bedarf hierbei einer Vielzahl unterschiedlicher Faktoren. Tal1 und RUNX1 zählen u.a. zu den essentiellen Transkriptionsfaktoren und sind innerhalb des Regulationsprozesses sehr wichtig. Daraus folgend sind sie besonders häufig Ziel genetischer Modifikationen während der Ausprägung von Leukämien [3, 4]. So führt die chromosomale Translokation t(8;21)(q22;q22) zur Entstehung des leukämischen Fusionsproteins RUNX1-ETO [10, 68]. Die Anwesenheit von RUNX1-ETO beeinflusst die Repression sowie Aktivierung einer Vielzahl von unterschiedlichen Genen, die vermehrt mit der direkten Induktion als auch Progression der akuten myeloischen Leukämie im Zusammenhang stehen [138, 142]. Hierbei sind eine große Anzahl von RUNX1-Zielgenen betroffen, da RUNX1-ETO ebenfalls über die RHD Domäne an DNA-Sequenzen mit dem RUNX1-Bindemotiv binden kann [124]. Neben der Expression klassischer proteinkodierender Gene ist auch die Regulation verschiedener microRNAs durch die Anwesenheit von RUNX-ETO beeinflusst. MiRNAs sind sowohl bei der Erhaltung der HSCs als auch während des Differenzierungsprozesses in die verschiedenen Linien von Bedeutung. Für die miR-451 konnte gezeigt werden, dass die Expression vornehmlich auf die erythroide Differenzierungslinie beschränkt ist. Darüber hinaus ist die miR-451 essentiell für die terminale Erythropoese und die Aktivierung des Lokus erfolgt spezifisch durch den erythroiden Transkriptionsfaktor GATA1 während der erythroiden Differenzierung [7, 200, 201].

Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung von microRNAs, die einen Einfluss auf die humane erythroide-megakaryozytäre Differenzierung ausüben. Hierbei sollte zunächst mittels miRNA-Sequenzierung von RUNX1 überexprimierenden K562 Zellen festgestellt werden, ob miRNAs im Vergleich zur Kontrolle differentiell exprimiert sind. Dabei kristallisierte sich heraus, dass die miR-451 durch die Überexpression von RUNX1 reprimiert wird. Da die bisherigen Ergebnisse zur miR-451 auf Studien im Mausmodell bzw. Zebrafisch beruhen, sollten diese im humanen System eruiert werden. Hierfür wurde die Expression der miR-451 zunächst in unterschiedlichen humanen Zelllinien sowie hCD34+ Zellen untersucht, sowie anschließend während der erythroiden sowie megakaryozytären Differenzierung. Da die miR-451 für die erythroide Differenzierung von großer Bedeutung ist und diese während der akuten myeloischen Leukämie dereguliert wird, sollte weiterführend überprüft werden, welchen Einfluss das leukämische Fusionsprotein RUNX1-ETO sowohl auf die Expression als auch Epigenetik des miR-144/451 Lokus ausübt. Die hieraus gewonnenen Ergebnisse sollen helfen,

---

die Wirkweise von RUNX1-ETO während der akuten myeloischen Leukämie weiter aufzuschlüsseln.

## 5. Ergebnisse

### 5.1. miR-451 während der Hämatopoese

#### 5.1.1. Identifikation von miRNAs, die während der erythroiden-megakaryozytären Differenzierung von Bedeutung sind

Zur Identifizierung von miRNAs, die bei der Hämatopoese von Bedeutung sind, wurden K562 Zellen lentiviral transduziert, sodass diese den Transkriptionsfaktor RUNX1 stabil überexprimierten. Die totale RNA der modifizierten Zellen wurde mittels einer miRNA-Sequenzierung hinsichtlich differentiell exprimierter miRNAs im Vergleich zu den Kontrollzellen, die lediglich mit dem Leervektor transduziert wurden, untersucht. Es wurden 387 miRNAs identifiziert, die in den *RUNX1* überexprimierenden Zellen eine signifikant veränderte Expression aufwiesen (Anhang; Tabelle 35). Hiervon war die Expression von 244 miRNAs hochreguliert, während die Expression von 143 miRNAs herabreguliert war (Abbildung 9).

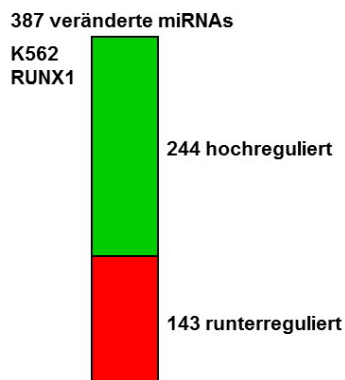


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Anzahl differentiell exprimierter miRNAs bei der miRNA-Sequenzierung in *RUNX1* überexprimierenden K562 Zellen.

Von den 387 veränderten miRNAs in den *RUNX1* überexprimierenden K562 Zellen war die Expression von 244 miRNAs hochreguliert. Bei 143 miRNAs wurde eine verminderte Expression gemessen.

Von diesen 387 differentiell exprimierten miRNAs konnten 30 miRNAs einer Rolle in der Hämatopoese zugeordnet werden. Hierbei war die Expression von 27 miRNAs hoch- und 3 miRNAs herunterreguliert (Tabelle 33).

Tabelle 33: Liste der 30 regulierten miRNAs in *RUNX1* überexprimierenden K562 Zellen, die während der Hämatopoese von Bedeutung sind

reife miRNA	log2 fache Veränderung
hsa-miR-126-3p	-1,21
hsa-miR-96-5p	-0,85
hsa-miR-451a	-0,74
hsa-miR-21-5p	0,42

reife miRNA	log2 fache Veränderung
hsa-miR-424-5p	0,71
hsa-miR-22-3p	0,79
hsa-miR-342-5p	0,98
hsa-miR-27a-3p	1,00
hsa-miR-223-3p	1,01
hsa-miR-146b-5p	1,03
hsa-miR-27b-3p	1,07
hsa-miR-144-3p	1,13
hsa-miR-15a-5p	1,18
hsa-miR-342-3p	1,53
hsa-miR-23a-3p	1,56
hsa-miR-142-5p	1,78
hsa-miR-181d-5p	1,79
hsa-miR-181b-5p	1,91
hsa-miR-34c-5p	1,94
hsa-miR-150-5p	2,21
hsa-miR-28-3p	2,21
hsa-miR-142-3p	2,24
hsa-miR-29a-3p	2,43
hsa-miR-181c-5p	2,45
hsa-miR-34a-5p	2,57
hsa-miR-222-3p	2,59
hsa-miR-28-5p	2,60
hsa-miR-10a-5p	2,91
hsa-miR-146a-5p	4,25
hsa-miR-221-3p	4,27

Da RUNX1 ein essentieller Transkriptionsfaktor während der Megakaryozyten-Entwicklung ist, lag der Fokus zur Validierung des miRNA-Sequenzierungsergebnisses auf den 11 miRNAs, die in der Literatur beschrieben wurden, eine Rolle bei der erythroiden-megakaryozytären Differenzierung zu spielen (Abbildung 10; Tabelle 34). Hierfür wurde die RNA der RUNX1 überexprimierenden Zellen bzw. der Kontrollzellen auf die Expression dieser 11 miRNAs hin untersucht.

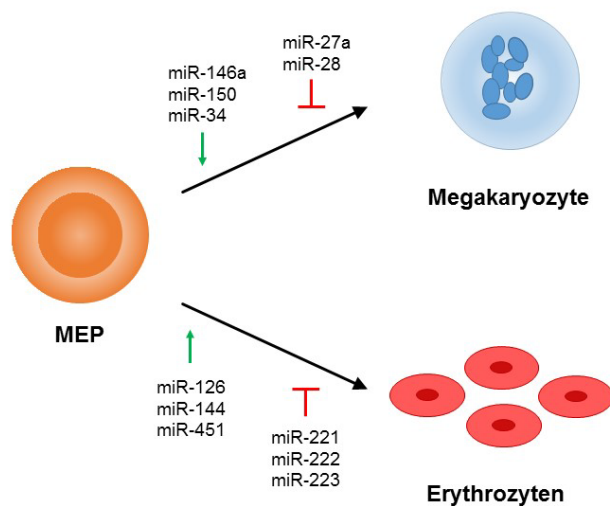


Abbildung 10: Schematische Darstellung der miRNAs, die an der erythroiden-megakaryozytären Differenzierung beteiligt sind.

Grüner Pfeil bedeutet eine positive Beeinflussung und der rote Pfeil verdeutlicht einen negativen Einfluss auf die Differenzierung.

Tabelle 34: Liste der 11 miRNAs, denen Aufgaben während der erythroiden bzw. megakaryozytären Differenzierung zugeschrieben werden

reife miRNA	Bedeutung während der Erythropoese bzw. Megakaryopoese
hsa-miR-27a-3p	erhöhte Expression während Megakaryopoese, Expression ist RUNX1 abhängig [166]
hsa-miR-28-3p	negative Korrelation mit Expression des erythroiden Rezeptorproteins CD71 [169]
hsa-miR-34a-5p	inhibiert Zellproliferation, begünstigt Megakaryozytendifferenzierung [167, 202]
hsa-miR-126-3p	erhöhte Expression nach Induktion erythroider Differenzierung in K562 & hCD34+ Zellen [203]
hsa-miR-144-3p	im Cluster mit miR-451 lokalisiert, exprimiert während Erythropoese [7]
hsa-miR-146a-5p	erhöhte Expression während Megakaryopoese [204]
hsa-miR-150-5p	fördert die Differenzierung von MEPs zu Megakaryozyten [168]
hsa-miR-221-3p	inhibiert normale Erythropoese [205]
hsa-miR-222-3p	inhibiert normale Erythropoese [205]
hsa-miR-223-3p	erhöhte Expression inhibiert Erythropoese [206]
hsa-miR-451a	erhöhte Expression während Erythropoese, wichtig für erythroide Homöostase [7, 186]

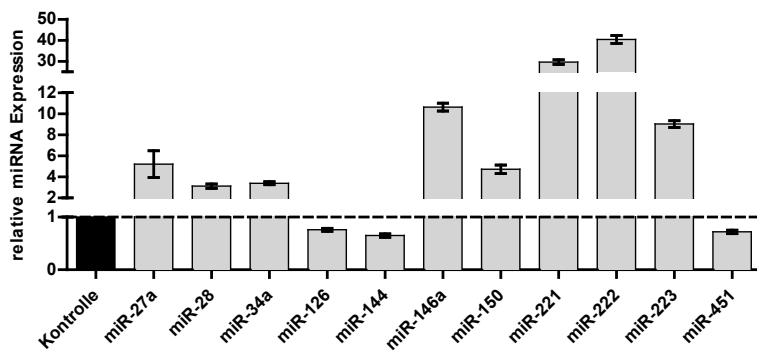


Abbildung 11: Validierung der miRNA-Sequenzierung.

K562 Zellen wurden lentiviral mit dem RUNX1-Überexpressionsvektor transduziert. Die totale RNA erfolgreich transduzierter Zellen wurde extrahiert und die reifen miRNAs mit Hilfe des miscript-Systems in qRT-PCR Experimenten analysiert. Die Expression der miRNAs miR-27a, miR-28, miR-34, miR-146a, miR-150, miR-221, miR-222 und miR-223 ist im Vergleich zur Leervektorkontrolle erhöht, während die Expression der miRNAs miR-126, miR-144 und miR-451 vermindert ist. Aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei unabhängigen Werten wurde die Standardabweichung ermittelt und als Fehlerbalken dargestellt.

Die hochregulierte Expression der miRNAs miR-27a, miR-28, miR-34, miR-146a, miR-150, miR-221, miR-222 und miR-223 aus dem Sequenzierungsexperiment konnte mittels qRT-PCR bestätigt werden. Die verminderte Expression der miRNAs miR-126 und miR-451 stimmte ebenfalls im qRT-PCR-Experiment mit den Sequenzierungsdaten überein (Tabelle 34). Nur die Expression der miR-144 sollte nach den Sequenzierungsdaten hochreguliert sein, wurde jedoch in der Überprüfung im qRT-PCR-Experiment runterreguliert gefunden (Abbildung 11). Da die miR-144 zusammen mit der miR-451 in einem Cluster lokalisiert ist, würde eine beidseitige Herunterregulation in Anwesenheit von RUNX1 wahrscheinlicher sein. Somit konnte die miRNA-Sequenzierung erfolgreich bestätigt werden.

### 5.1.2. Expression der miRNAs miR-144 und miR-451 während der erythroiden bzw. megakaryozytären Differenzierung

Unter anderem Dore *et al.* [7] und Pase *et al.* [201] konnten zeigen, dass die miR-451 während der Erythrozyten-Differenzierung verstärkt exprimiert wird und zudem für die erythroide Differenzierung von großer Bedeutung ist, da die miR-451 eine regulatorische Wirkung auf den Transkriptionsfaktor GATA1 hat. Daher wurde die Expression des Clusters in verschiedenen Zellsystemen und während der Differenzierung untersucht.



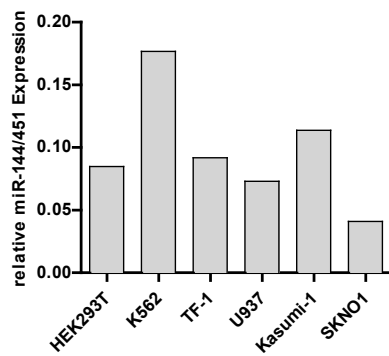


Abbildung 12: miR-144/451 Expression in verschiedenen Zelllinien.

Die Expression des miR-144/451 Clusters wurde in den Erythroleukämie-Zelllinien K562 und TF-1, sowie der Monozyten-Zelllinie U937, der Nierenzelllinie HEK293T und den AML-Zelllinien Kasumi-1 und SKNO1 nachgewiesen mittels qRT-PCR. Die Expression wurde prozentual zur Expression des Referenzgens *GAPDH* berechnet.

Die Expression des miR-144/451 Clusters war in der Erythroleukämie-Zelllinie K562 am höchsten, während die Expression des Clusters in der ebenfalls erythroleukämischen Zelllinie TF-1 bzw. in der Monozyten-Zelllinie U937 sich auf dem niedrigeren Niveau der embryonalen Nierenzelllinie HEK293T befand. Im Vergleich zur Zelllinie K562 wiesen die AML-Zelllinien Kasumi-1 und SKNO1 eine verminderte Expression des miR-144/451 Clusters auf (Abbildung 12).

Für die megakaryozytären bzw. erythroiden Differenzierungsexperimente wurden K562, TF-1 und hCD34+ Zellen verwendet. Die erfolgreiche Differenzierung der jeweiligen Zellen wurde mittels qRT-PCR spezifischer Differenzierungsgene oder FACS über deren Exposition an der Zelloberfläche hin untersucht. Zur Bestätigung der erythroiden Differenzierung wurde die Expression des Oberflächenmarkers *Glykophorin A (GYPA)* bzw. des Transferrinrezeptors (*CD71*) gemessen, die jeweils erhöht während der Erythropoese vorliegt. Während der megakaryozytären Differenzierung ist die Expression dieser erythroiden Gene reduziert, jedoch die Expression des integralen Membranproteins *CD41 (Integrin alpha chain 2b)* erhöht [34-37]. Die Expression von *GYPA* und *CD71* war im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle erhöht in K562, die mit Hemin behandelt wurden, sowie in TF-1 und hCD34+ Zellen, deren Medium EPO beigefügt wurde (Abbildung 13 A-C). Demnach war die erythroide Differenzierung erfolgreich in den verschiedenen Zellsystemen induziert worden.

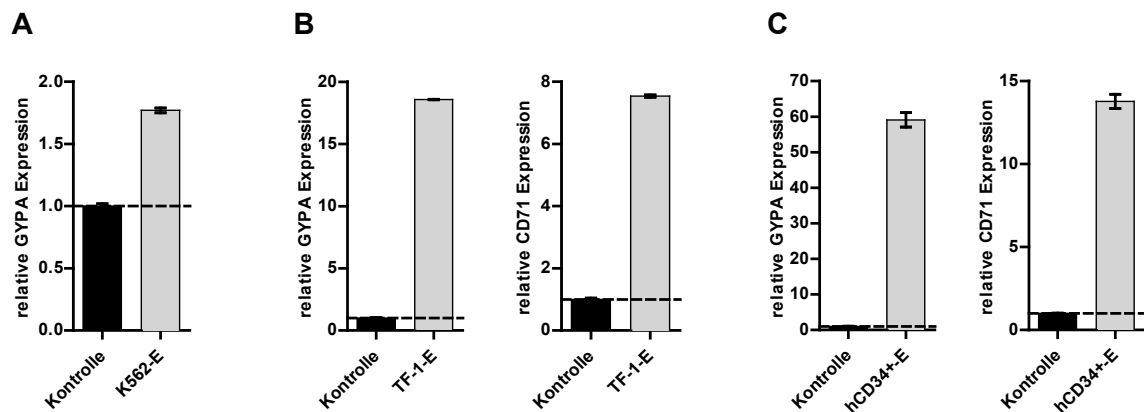


Abbildung 13: Veränderung der *Glykophorin A* und *CD71* Expression nach Induktion erythroider Differenzierung in den Zelllinien K562 und TF-1 bzw. humanen CD34+ Zellen.

(A) K562 Zellen, die mit 30  $\mu$ M Hemin behandelt wurden, wiesen eine erhöhte *GYPA* Expression im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen auf. (B) TF-1 Zellen wurden mit 1 U EPO behandelt, wodurch die Expression von *GYPA* sowie *CD71* stark anstieg. (C) Humane CD34+ Zellen wurden in dem erythroiden Differenzierungsmedium kultiviert und wiesen im Vergleich zu expandierten Kontrollzellen eine stark erhöhte Expression der Gene *GYPA* und *CD71* auf. Aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei unabhängigen Werten wurde die Standardabweichung ermittelt und als Fehlerbalken dargestellt.

Zur Induktion der megakaryozytären Differenzierung wurde das Medium von K562 Zellen mit TPA versetzt. Die auf diese Weise behandelten K562 Zellen wiesen eine erhöhte *CD41* Expression im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen auf (Abbildung 14 A). Humane CD34+ Zellen, bei denen die Megakaryozyten-Differenzierung induziert wurde, zeigten eine deutlich reduzierte Expression des erythroiden Proteins Glykophorin A (Abbildung 14 B).

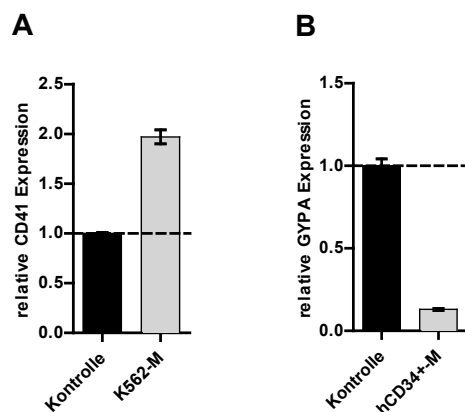


Abbildung 14: Veränderung der *CD41* und *Glykophorin A* Expression nach Induktion megakaryozytärer Differenzierung in K562 und hCD34+ Zellen.

(A) K562 Zellen, die mit 30 nM TPA behandelt wurden, wiesen eine erhöhte *CD41* Expression im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen auf. (B) Humane CD34+ Zellen wurden in dem megakaryozytären Differenzierungsmedium kultiviert und wiesen im Vergleich zu expandierten Kontrollzellen eine stark verminderte *Glykophorin A* Expression auf. Aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei unabhängigen Werten wurde die Standardabweichung ermittelt und als Fehlerbalken dargestellt.

Zusätzlich zu den qRT-PCR Experimenten wurde die Differenzierung der hCD34+ Zellen mittels FACS kontrolliert. Hierbei wurden die expandierten sowie differenzierten Zellen mit

spezifischen Antikörpern angefärbt. Die in grau dargestellten expandierten Zellen spiegeln den Ausgangspunkt wieder, während die in Rot für Glykophorin A (CD235a), in Gelb für CD71 und in Blau für CD41 die angefärbten, differenzierten Zellen darstellen. Die Verschiebung der jeweiligen Populationen nach rechts ergibt eine erhöhte Anwesenheit der Oberflächenmarker GYPA und CD71 nach Induktion der erythroiden Differenzierung, sowie eine erhöhte Exposition von CD41 während der megakaryozytären Differenzierung (Abbildung 15).

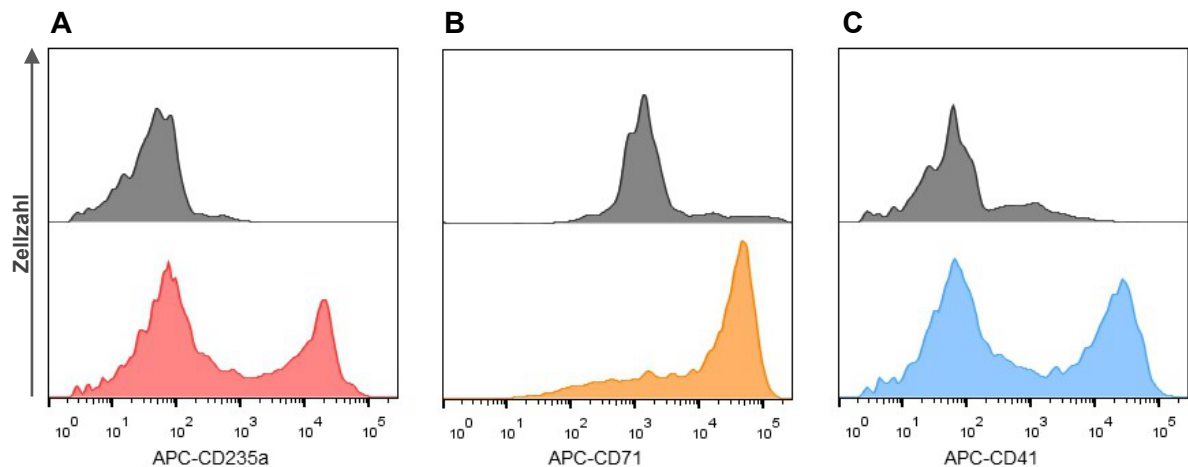


Abbildung 15: Veränderung der Exposition der Oberflächenmarker Glykophorin A (CD235a), CD71 und CD41 nach Induktion erythroider bzw. megakaryozytärer Differenzierung in hCD34+ Zellen. Mittels FACS-Messungen wurde die Exposition der Oberflächenproteine Glykophorin A (**A**) und CD71 (**B**) nach erythroider Differenzierung von hCD34+ Zellen bestimmt sowie die Oberflächenpräsenz von CD41 (**C**) nach megakaryozytärer Differenzierung. Expandierte undifferenzierte hCD34+ Zellen sind im oberen Abschnitt in grau dargestellt, während im unteren Abschnitt die jeweils angefärbten differenzierten hCD34+ Zellen abgebildet sind.

Nach erfolgreicher Differenzierung des jeweiligen Zellsystems wurde das Expressionsniveau des miR-144/451 Clusters bestimmt. Eine Induzierung der Megakaryozyten-Differenzierung resultierte in einer verminderten miR-144/451 Expression in den K562 sowie hCD34+ Zellen (Abbildung 16 A-B), während nach einer Induzierung der erythroiden Differenzierung es zu einer gesteigerten miR-144/451 Expression in den verschiedenen Zellsystemen kam (Abbildung 16 C-E).

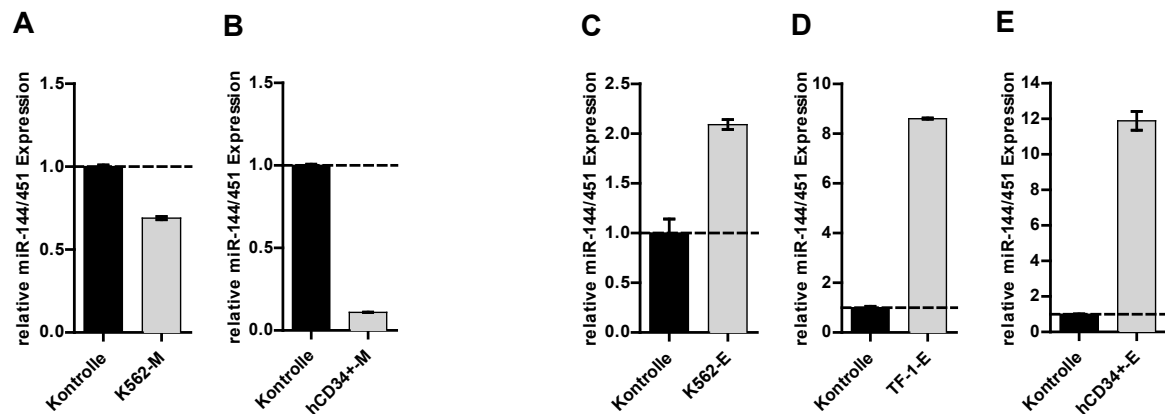


Abbildung 16: Veränderung der miR-144/451 Expression nach Induktion der megakaryozytären bzw. erythroiden Differenzierung in K562, TF-1 und hCD34+ Zellen.

(A) Megakaryozytäre Differenzierung in K562 durch Zugabe von 30 nM TPA ins Kultivierungsmedium reduzierte die miR-144/451 Expression. (B) hCD34+ Zellen, die in megakaryozytärem Differenzierungsmedium kultiviert wurden, wiesen eine deutlich geringere Expression des miR-144/451 Clusters auf als undifferenzierte Kontrollzellen. (C) Die Induktion der erythroiden Differenzierung in K562 Zellen durch Zugabe von 30 µM Hemin bzw. durch 1 U EPO in TF-1 Zellen (D) resultierte in einer gesteigerten Expression des miR-144/451 Clusters. (E) hCD34+ Zellen, die in erythroiden Differenzierungsmedium kultiviert wurden, wiesen eine drastisch erhöhte Expression des miR-144/451 Clusters auf im Vergleich zu undifferenzierten Kontrollzellen. Aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei unabhängigen Werten wurde die Standardabweichung ermittelt und als Fehlerbalken dargestellt.

### 5.1.3. miR-451 induziert erythroide Differenzierung in hCD34+ Zellen

Da die Expression des miR-144/451 Clusters während der erythroiden Differenzierung erhöht ist, sollte im Folgenden festgestellt werden, ob die miRNAs miR-144 bzw. miR-451 alleine die erythroide Differenzierung von humanen CD34+ Zellen bedingen kann. Hierfür wurden hCD34+ Zellen mit lentiviralen Konstrukten transduziert, die die Expression der einen miRNA in Kombination mit der *Seed*-Sequenz-Mutante der zweiten miRNA ermöglichte. Auf diese Weise wurde nur eine funktionell aktive miRNA in der Zelle exprimiert und die Prozessierung der einzelnen miRNAs aus dem Cluster nicht verändert. Zunächst wurde die Expression des Clusters, bestehend aus einer aktiven bzw. mutierten miRNA und deren Doppelmutante, in K562 Zellen nachgewiesen (Abbildung 17).

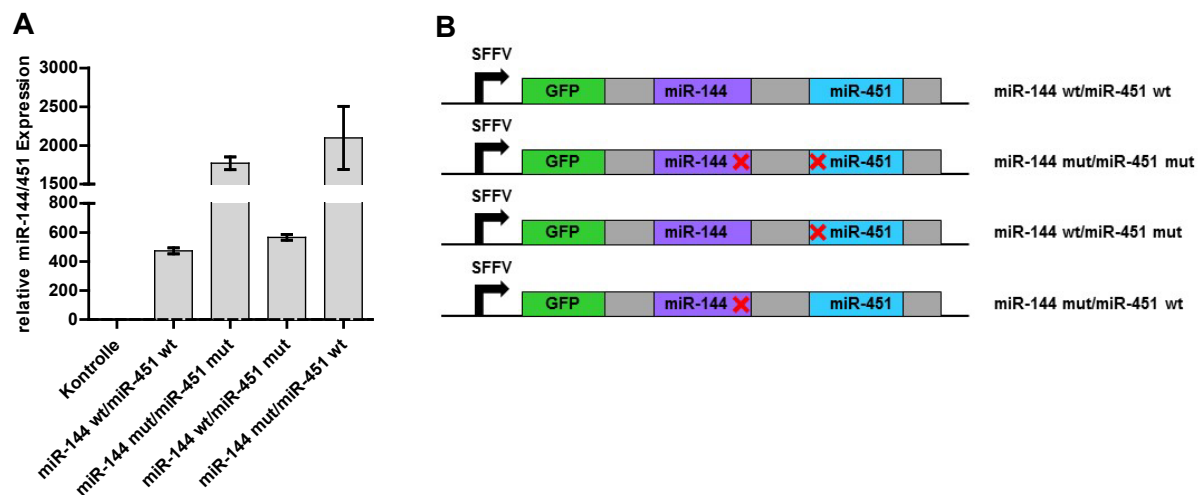


Abbildung 17: Nachweis der Überexpression des Wildtyp- bzw. mutierten miR-144/451 Clusters in lentiviral transduzierten K562 Zellen.

**(A)** K562 Zellen wurden lentiviral mit den Überexpressionskonstrukten des miR-144/451 Clusters transduziert. Hierbei war die erreichte Überexpression des Wildtypclusters ähnlich dem Konstrukt, der die mutierte *Seed*-Sequenz der miR-451 enthielt. Das Konstrukt der Doppelmutante, in der beide *Seed*-Sequenzen mutiert vorlagen, und das Konstrukt, in dem die *Seed*-Sequenz der miR-144 mutiert war, erreichten eine höhere Überexpression. Aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei unabhängigen Werten wurde die Standardabweichung ermittelt und als Fehlerbalken dargestellt. **(B)** Schematische Darstellung der miR-144/451 Expressionskonstrukte mit den jeweiligen Mutationen (rotes Kreuz).

Die anschließend durchgeführten koloniebildenden Wachstumsexperimente (CFU-Assay) mit transduzierten hCD34+ Zellen (Abbildung 18), die diese miRNA exprimierenden Konstrukte aufwiesen, ergaben bei dem Konstrukt, welches die funktionale miR-451 und mutierte miR-144 exprimierte (Abbildung 19 A Spalte 5), eine erhöhte erythroide Kolonieanzahl im Vergleich zum Wildtyp-Konstrukt (Abbildung 19 A Spalte 2). Im Gegensatz dazu wies das Konstrukt mit der mutierten miR-451 sowohl in der Doppel- (Abbildung 19 A Spalte 3) als auch Einzelmutante (Abbildung 19 A Spalte 4) einen geringeren erythroiden Anteil der Kolonien auf. Demnach induziert eine erhöhte Anwesenheit der miR-451 die erythroide Differenzierung in humanen CD34+ Zellen. Dieser Effekt konnte ebenfalls für hCD34+ Zellen beobachtet werden, die Tal1 überexprimierten (Abbildung 19 B). Der Prozentansatz an erythroiden Kolonien verdoppelte sich nahezu. Dieses Experiment diente auch als Kontrolle, dass die CFU-Assays funktional sind, da Tal1 ein beschriebener Transkriptionsfaktor ist, der die erythroide Differenzierung induziert [48].

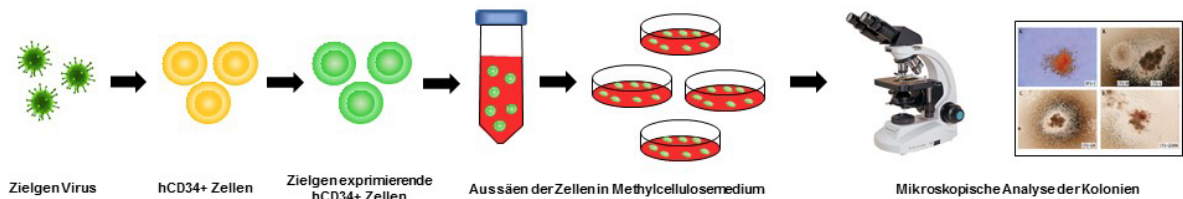


Abbildung 18: Schematische Darstellung der Durchführung des koloniebildenden Wachstumsexperiments (CFU-Assay)

hCD34+ Zellen werden mit Viren, die für das Zielgen kodieren, transduziert. Nach der Selektion erfolgreich transduzierter Zellen mittels der Expression des Reportergens GFP, werden diese in Methylcellulosemedium ausgesät. Die nach 12 Tagen gebildeten Kolonien werden anschließend im Mikroskop analysiert.

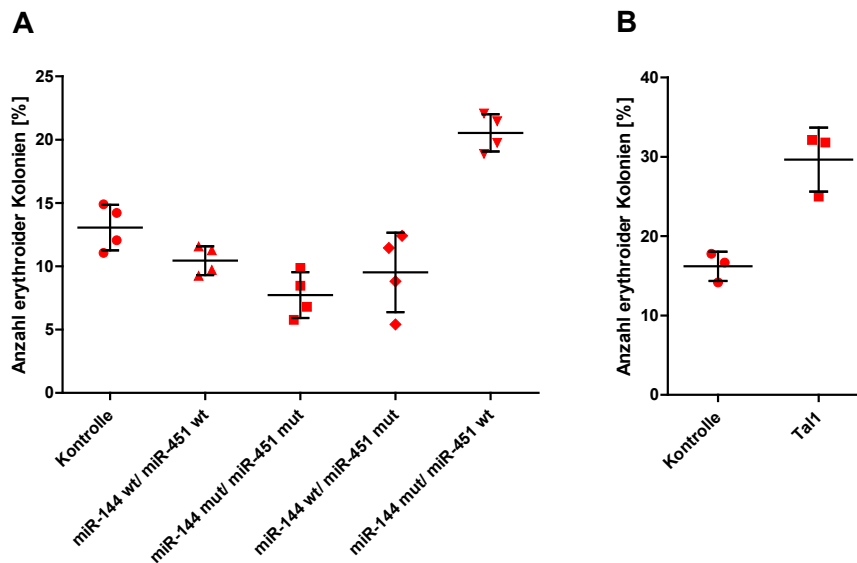


Abbildung 19: miR-451 und Tal1 erhöhen die Anzahl an erythroiden Kolonien im CFU-Assay mit transduzierten hCD34+ Zellen.

**(A)** Humane CD34+ Zellen wurden lentiviral mit Überexpressionskonstrukten transduziert, die die Wildtyp- bzw. mutierten *Seed*-Sequenzen der miR144 oder miR-451 im Cluster enthielten. Das Konstrukt, das die mutierte *Seed*-Sequenz der miR-144 und die funktionale Sequenz der miR-451 exprimierte, zeigte eine deutliche Erhöhung der erythroiden Kolonieanzahl im Vergleich zur Leervektor- oder Wildtypkontrolle. **(B)** hCD34+ Zellen, die *Tal1* überexprimierten, wiesen eine doppelt so hohe Erythrozytenzahl auf als die Kontrolle. Aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei unabhängigen Werten wurde die Standardabweichung ermittelt und als Fehlerbalken dargestellt.

#### 5.1.4. Regulation der Expression des miR-144/451 Clusters durch hämatopoetische Transkriptionsfaktoren

Zu den wichtigen hämatopoetischen Transkriptionsfaktoren, die an der megakaryozytären bzw. erythroiden Differenzierung beteiligt sind, zählen neben RUNX1 ebenso GATA1 sowie Tal1. In vorherigen Arbeiten im Labor konnte gezeigt werden, dass RUNX1 zusammen mit Tal1 ein entscheidender Regulator der Differenzierung von megakaryozytären-erythroiden Vorläuferzellen (MEPs) darstellt [207]. Darauf beziehend wurde nachfolgend untersucht, ob neben RUNX1 auch Tal1 und GATA1 einen Einfluss auf die Expression der miRNAs miR-144 und miR-451 ausüben.

Eine Überexpression des megakaryozytären Transkriptionsfaktors *RUNX1* in K562 Zellen führte zu einer Herunterregulierung der miR-144/451 Expression (Abbildung 20 A-B) bzw. Abbildung 11 für die reife miR-144 und miR-451. Außerdem wurde, wie in Kuvardina *et al.* [207] beschrieben, die Expression des erythroiden Markerproteins *Glykophorin A* deutlich reduziert (Abbildung 20 C).

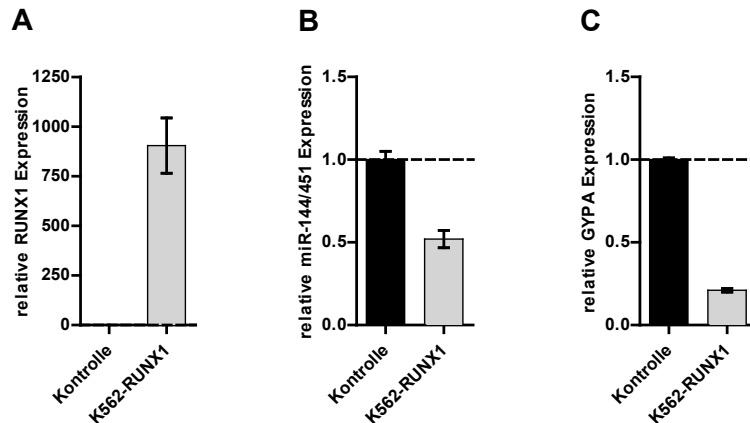


Abbildung 20: Überexpression von *RUNX1* reprimiert die Expression des miR-144/451 Clusters sowie von *Glykophorin A* in K562 Zellen.

K562 Zellen wurden lentiviral mit dem *RUNX1*-Überexpressionsvektor transduziert und die Expression mittels qRT-PCR bestimmt. **(A)** Kontrolle der Überexpression von *RUNX1* in transduzierten K562 Zellen. **(B)** Die Überexpression von *RUNX1* reprimiert die Expression des miR-144/451 Clusters. **(C)** Die Expression des erythroiden Gens *Glykophorin A* (*GYPA*) ist erheblich herunterreguliert bei Überexpression von *RUNX1*. Aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei unabhängigen Werten wurde die Standardabweichung ermittelt und als Fehlerbalken dargestellt.

Im Gegensatz dazu erhöhte eine Überexpression der Transkriptionsfaktoren *Tal1* und *GATA1*, die essentiell sind für die erythroide Differenzierung, in K562 Zellen die miR-144/451 Expression. Während bei der *Tal1*-Überexpression die Expression des Clusters der miR-144/451 (Abbildung 21 A-B) leicht erhöht ist, verstärkt die Überexpression von *GATA1* die Expression der miR-144/451 erheblich (Abbildung 21 E-F). Die Überexpression von *Tal1* führte ebenfalls zu einer gesteigerten Expression des beschriebenen erythroiden Zielgens *Glykophorin A*, die sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf der Zelloberfläche mittels FACS nachgewiesen werden konnte (Abbildung 21 C-D).

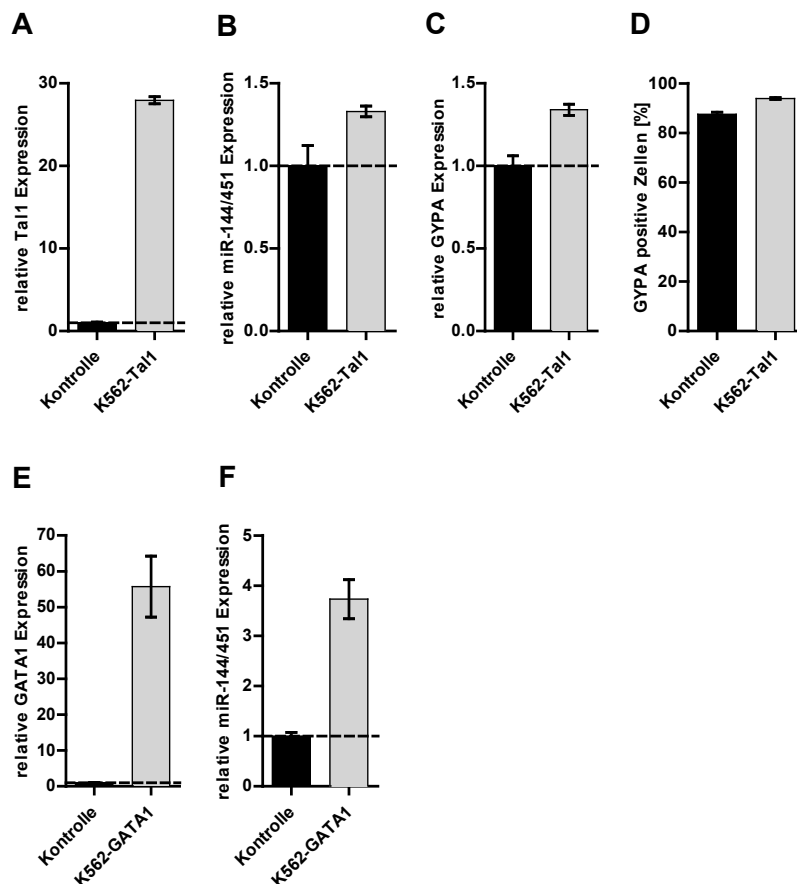


Abbildung 21: Überexpression von *Tal1* und *GATA1* erhöht die Expression des miR-144/451 Clusters und von Glykophorin A in K562 Zellen.

K562 Zellen wurden lentiviral mit *Tal1*- bzw. *GATA1*-Überexpressionsvektoren transduziert und die Expression mittels qRT-PCR nachgewiesen. (A) Kontrolle der Überexpression von *Tal1* in transduzierten K562 Zellen. (B) Die Überexpression von *Tal1* erhöht die Expression des miR-144/451 Clusters. (C) Die Expression des erythroiden Gens *Glykophorin A* (GYPA) ist heraufreguliert bei Überexpression von *Tal1*. (D) Die Überexpression von *Tal1* erhöht die Anzahl an GYPA positiven K562 Zellen. (E) Kontrolle der Überexpression von *GATA1* in transduzierten K562 Zellen. (F) Die Überexpression von *GATA1* erhöht erheblich die Expression des miR-144/451 Clusters. Aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei unabhängigen Werten wurde die Standardabweichung ermittelt und als Fehlerbalken dargestellt.

In den nachfolgenden *Knockdown*-Studien sollten diese Ergebnisse bestätigt werden. Hierfür wurden K562 Zellen mit jeweils zwei verschiedenen shRNAs gerichtet gegen *RUNX1*, *Tal1* sowie *GATA1* transduziert. Für diesen Versuch wurden die zwei shRNA Konstrukte verwendet, die im Westernblot nachweislich die Proteinexpression am deutlichsten reprimierten [208].

Mittels qRT-PCR wurde anschließend die Effizienz der Herunterregulation des betreffenden Transkriptionsfaktors bestimmt sowie die Expression der reifen miR-451 bzw. des miR-144/451 Clusters. Der *Knockdown* von *RUNX1* war erfolgreich und reduzierte die *RUNX1* Expression auf etwa 50 % und führte zu einer verstärkten Expression des miR-144/451 Clusters (Abbildung 22 A-B).



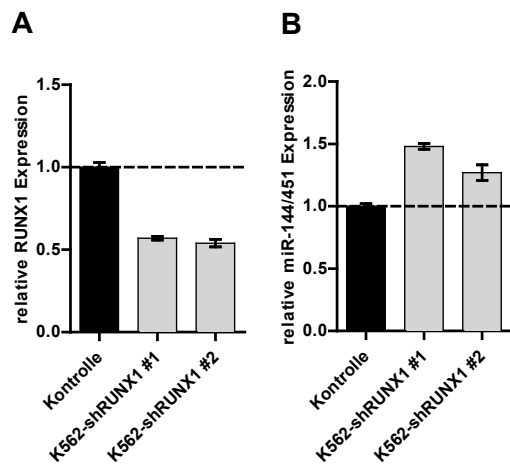
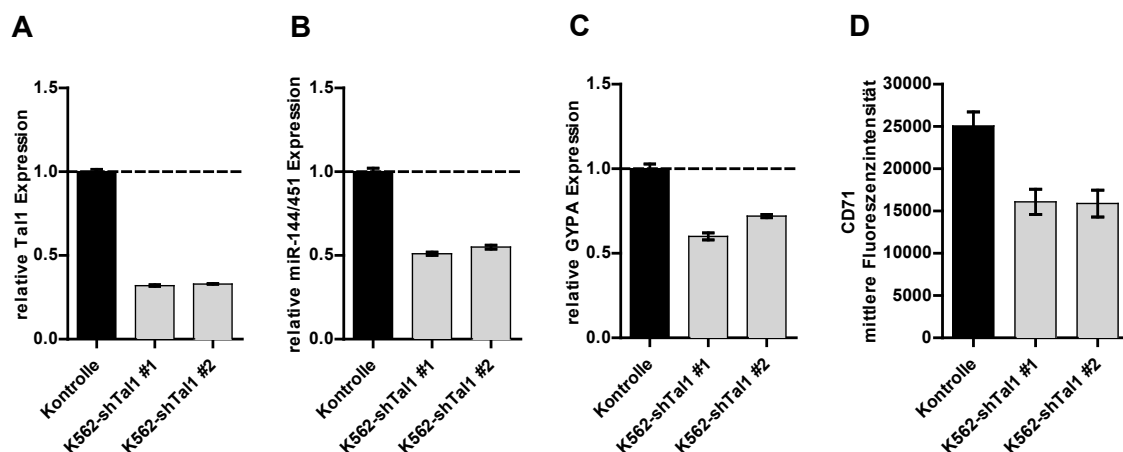


Abbildung 22: *Knockdown* von *RUNX1* erhöht die Expression des miR-144/451 Clusters in K562 Zellen. K562 Zellen wurden lentiviral mit zwei verschiedenen *RUNX1-Knockdown*-Konstrukten transduziert und die Expression mittels qRT-PCR bestimmt. **(A)** Nach *Knockdown* von *RUNX1* sinkt die Expression von *RUNX1* in transduzierten K562 Zellen. **(B)** Der *Knockdown* von *RUNX1* erhöht die Expression des miR-144/451 Clusters. Aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei unabhängigen Werten wurde die Standardabweichung ermittelt und als Fehlerbalken dargestellt.

Die Herunterregulation der *Tal1*- und *GATA1*-Expression konnte erfolgreich auf mRNA-Ebene gezeigt werden (Abbildung 23 A, E). Diese resultiert in einer ebenfalls verminderten Expression des miR-144/451 Clusters sowie des *Glykophorin A* (Abbildung 23 B-C, F-G). Mittels FACS-Messung konnte bei den K562 Zellen, die die *Knockdown*-Konstrukte gegen *Tal1* bzw. *GATA1* exprimierten, eine verminderte Oberflächenexpression des erythroiden Markerproteins CD71 festgestellt werden (Abbildung 23 D, H). Die Ergebnisse der *Knockdown*-Experimente bestätigen die Resultate der Überexpressionsexperimente, da sie sich, wie erwartet, gegensätzlich verhalten.



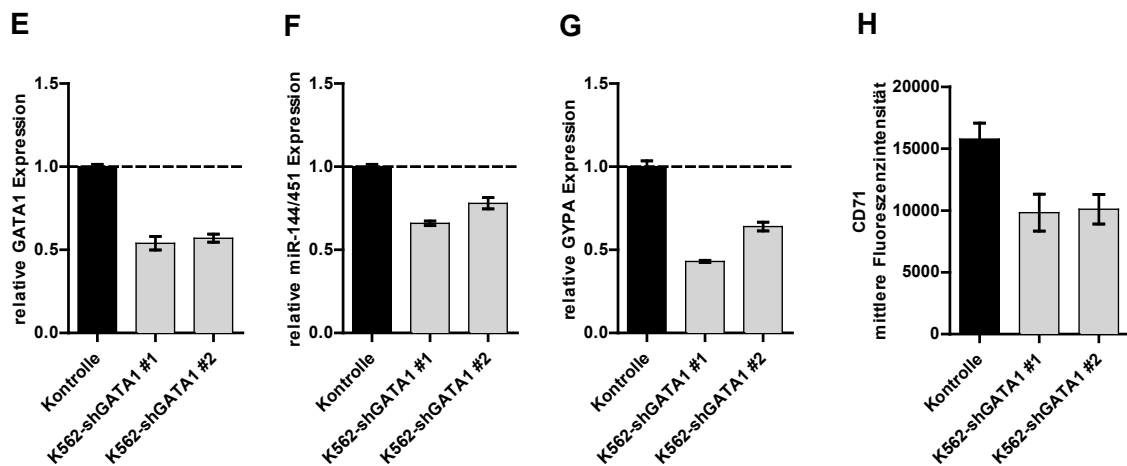


Abbildung 23: *Knockdown* von *Tal1* und *GATA1* reprimiert die Expression des *miR-144/451* Clusters sowie die Expression der erythroiden Gene *GYPA* und *CD71* in K562 Zellen. K562 Zellen wurden lentiviral mit zwei verschiedenen *Tal1* bzw. *GATA1* *Knockdown*-Konstrukten transduziert und die Expression mittels qRT-PCR bestimmt. (A) Nach *Knockdown* von *Tal1* sinkt die Expression von *Tal1* in transduzierten K562 Zellen. (B) Der *Knockdown* von *Tal1* reprimiert die Expression des *miR-144/451* Clusters. (C) Die Expression von Glykophorin A ist vermindert beim *Knockdown* von *Tal1*. (D) Der *Knockdown* von *Tal1* führt zu einer reduzierten Okkupation von *CD71* auf der Zelloberfläche von transduzierten K562 Zellen. Diese konnte mittels FACS nachgewiesen werden. (E) Nach *Knockdown* von *GATA1* sinkt die Expression von *GATA1* in transduzierten K562 Zellen. (F) Der *Knockdown* von *GATA1* führt zu einer reprimierten Expression des *miR-144/451* Clusters. (G) Die Expression von Glykophorin A ist vermindert nach *GATA1* *Knockdown*. (H) Mittels FACS konnte eine reduzierte Okkupation von *CD71* auf der Zelloberfläche von transduzierten K562 Zellen nach *Knockdown* von *GATA1* nachgewiesen werden. Aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei unabhängigen Werten wurde die Standardabweichung ermittelt und als Fehlerbalken dargestellt.

Die veränderte Expression des *miR-144/451* Clusters nach *Knockdown* der Transkriptionsfaktoren *RUNX1*, *Tal1* und *GATA1* konnte ebenfalls für die reife, prozessierte *miR-451* gezeigt werden (Abbildung 24 A-C). Während die verminderte Expression von *RUNX1* zu einer leichten Erhöhung der reifen *miR-451* führte, reduzierte die herabgesetzte Expression von *Tal1* und *GATA1* den Anteil der reifen *miR-451* im Vergleich zur Kontrolle.

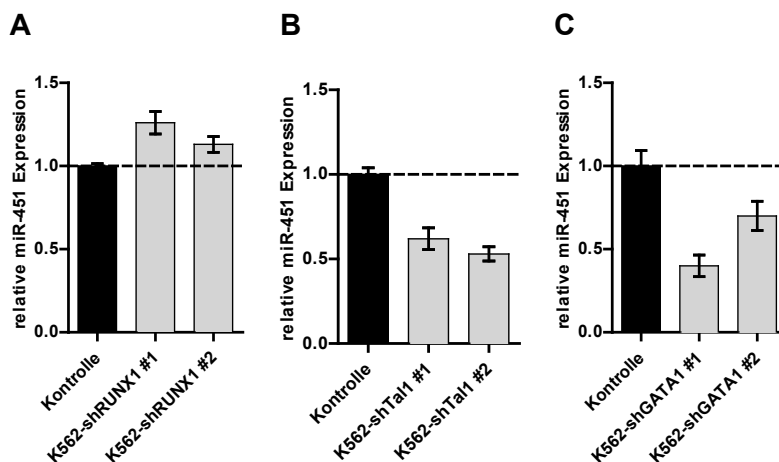


Abbildung 24: *Knockdown* von *RUNX1* erhöht die Expression der *miR-451*, während der *Knockdown* von *Tal1* und *GATA1* die Expression der *miR-451* reprimiert in K562 Zellen. K562 Zellen wurden lentiviral mit zwei verschiedenen *RUNX1*, *Tal1* bzw. *GATA1* *Knockdown*-Konstrukten transduziert und die Expression der *miR-451* mittels des miscript-Systems in qRT-PCR bestimmt. (A) *Knockdown*

von *RUNX1* führt zu einer leichten Erhöhung der reifen miR-451 in transduzierten K562 Zellen. **(B)** Der *Knockdown* von *Tal1* senkt den Gehalt an der reifen miR-451. **(C)** Die Anwesenheit der reifen miR-451 ist vermindert beim *Knockdown* von *GATA1*. Aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei unabhängigen Werten wurde die Standardabweichung ermittelt und als Fehlerbalken dargestellt.

### 5.1.5. Regulation der Promotor- bzw. Enhanceraktivität des miR-144/451 Clusters durch hämatopoetische Transkriptionsfaktoren

Die Expression des miR-144/451 Clusters wird von einem eigenen Promotor gesteuert, jedoch konnte Dore *et al.* [7] in ChIP-Experimenten für den Mausloкус zeigen, dass GATA1 verstärkt in einem Bereich weit außerhalb des Promotors (-2,8 kb) bindet. Dies deutet darauf hin, dass sich dort ein regulatorischer Bereich, ein sogenannter *Enhancer*-Bereich, befindet.

Der Promotor- bzw. *Enhancer*-Bereich wurde zunächst in HEK293T und K562 Zellen auf ihre Eigenaktivität hin untersucht. Wie in Abbildung 25 deutlich zu erkennen ist, ist die Aktivität des Promotor- sowie des *Enhancer*-Bereiches in den K562 Zellen, die dem hämatopoetischen Zellsystem verwandter sind, deutlich höher als in den HEK293T Zellen.

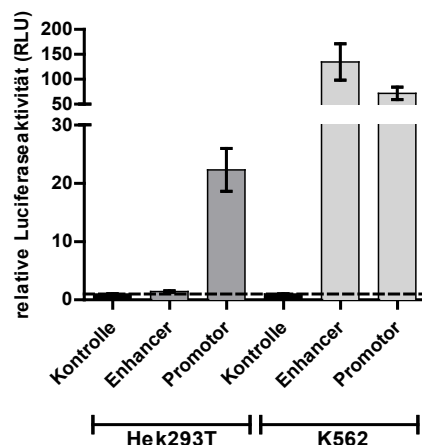


Abbildung 25: Messung der Eigenaktivität des Promotor- und *Enhancer*-Bereiches des miR-144/451 Lokus in HEK293T und K562 Zellen.

Im Luciferase Assay wurde die Eigenaktivität des Promotor- und *Enhancer*-Bereiches des miR-144/451 Lokus untersucht. Hierfür wurden HEK293T sowie K562 Zellen mit dem Promotor- bzw. *Enhancer*-Konstrukt transfiziert. In HEK293T Zellen ist der Promotor des miR-144/451 aktiver, während in den K562 Zellen der *Enhancer*-Bereich eine höhere Eigenaktivität zeigt. Die Eigenaktivität der miR-144/451 Lokusbereiche ist in den K562 Zellen deutlich höher als in den HEK293T Zellen. Aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei unabhängigen Werten wurde die Standardabweichung ermittelt und als Fehlerbalken dargestellt.

Anhand der Ergebnisse von den Expressionsanalysen sowie der Eigenaktivitätsmessung des Promotor- bzw. *Enhancer*-Bereiches, konnte nun davon ausgegangen werden, dass hämatopoetische Transkriptionsfaktoren, die in K562 Zellen exprimiert werden, eine Rolle bei der Aktivierung dieser regulatorischen Bereiche spielen. Daraufhin wurde der Lokus der miR-144/451 auf deren Bindestellen hin *in silico* analysiert.

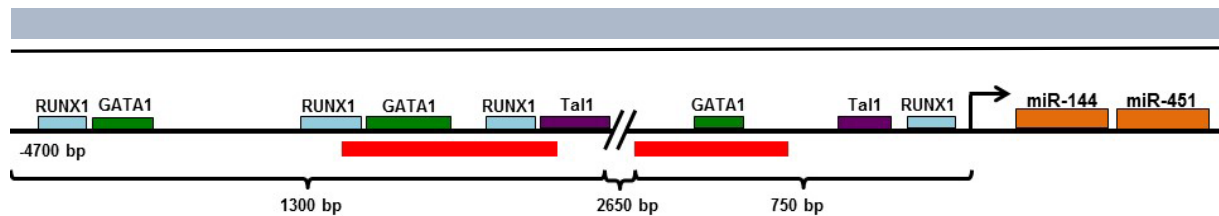


Abbildung 26: Schematische Darstellung des humanen miR-144/451 Lokus.

*In silico* vorausgesagte Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren RUNX1 (blau), Tal1 (violett) und GATA1 (grün) wurden sowohl im Promotorbereich (-750 bp) als auch in einem regulatorischen Bereich 3400-4700 bp *upstream* (*Enhancer*-Bereich) markiert. Der Pfeil symbolisiert den Transkriptionsstart des miR-144/451 Clusters. Hochkonservierte Bereiche sind in rot markiert und der 2650 bp große Bereich zwischen der Promotor- und *Enhancer*-Region ist nicht konserviert.

Im Bereich von 750 bp *upstream* der miR-144 Sequenz befindet sich die Promotorregion. Diese weist neben Bindestellen für RUNX1 und Tal1 eine hochkonservierte Region im Bereich der GATA1-Bindestelle auf. Eine weitere regulatorische Region befindet sich 3400-4700 bp *upstream* der miR-144 Sequenz, die im Weiteren als *Enhancer*-Bereich bezeichnet wird. Innerhalb dieser 1300 bp befinden sich mehrere gebündelte Regionen mit Bindestellen für GATA1, RUNX1 und Tal1 sowie einen hochkonservierten Bereich. Zwischen dem *Enhancer*- und Promoterbereich gibt es einen etwa 2650 bp großen, nicht konservierten Bereich. Dieser diente in ChIP-Experimenten als Kontrollregion (Abbildung 26).

Luciferase Assays mit transfizierten K562 Zellen ergaben, dass GATA1 sowohl auf den Promotor als auch *Enhancer* aktivierend wirkt. Die Transfektion mit Tal1 alleine veränderte nicht die Aktivität der Luciferase beider Bereiche, jedoch in Kombination mit dessen Cofaktor E47 wirkte der Komplex ebenso aktivierend auf den Promotor sowie *Enhancer*. RUNX1 hingegen reprimierte sowohl die Aktivität des Promotors als auch *Enhancer*-Bereiches (Abbildung 27 A-B).

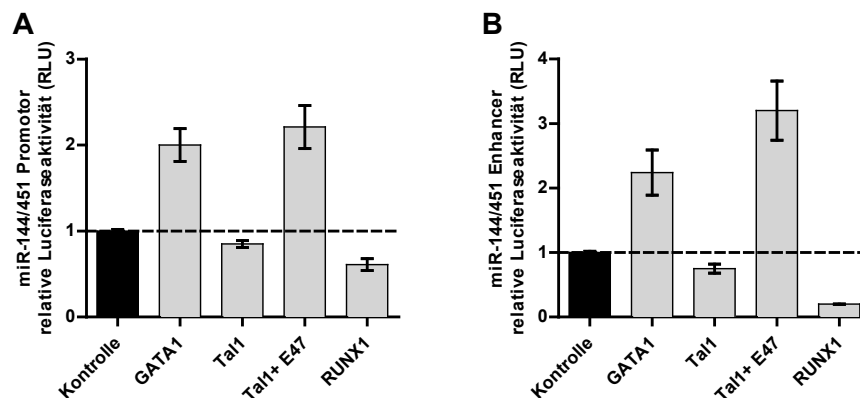


Abbildung 27: GATA1 und Tal1/E47 wirken aktivierend auf den miR-144/451 Promotor- und *Enhancer*-Bereich, während RUNX1 die Aktivität reprimierte in K562 Zellen.

K562 Zellen wurden sowohl mit dem Promotor- bzw. *Enhancer*-Konstrukt transfiziert als auch mit den jeweiligen Transkriptionsfaktoren. Nach 48h wurde die Luciferaseaktivität gemessen. **(A)** Im Luciferase Assay mit K562 Zellen wirken GATA1 und Tal1+E47 aktivierend auf den Promotorbereich des miR-144/451 Lokus, während Tal1 alleine keinen Einfluss auf die Luciferaseaktivität zeigt und RUNX1 die Aktivität des Promotors herabsenkt. **(B)** Auf den *Enhancer*-Bereich wirken im Luciferase Assay mit K562 Zellen GATA1 und Tal1+E47 aktivierend, während Tal1 alleine wieder keinen Einfluss auf die Luciferaseaktivität zeigt und RUNX1 die Aktivität des *Enhancers* stark

reprimiert. Aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei unabhängigen Werten wurde die Standardabweichung ermittelt und als Fehlerbalken dargestellt.

In Luciferase Assays mit K562 Zellen, die *Knockdown*-Konstrukte gegen GATA1 bzw. Tal1 exprimierten, konnte der gegenteilige Effekt beobachtet werden. So führt die Verminderung der *GATA1*- und *Tal1*-Expression zu einer Repression der Promotor- sowie *Enhancer*-Aktivität (Abbildung 28 A-B).

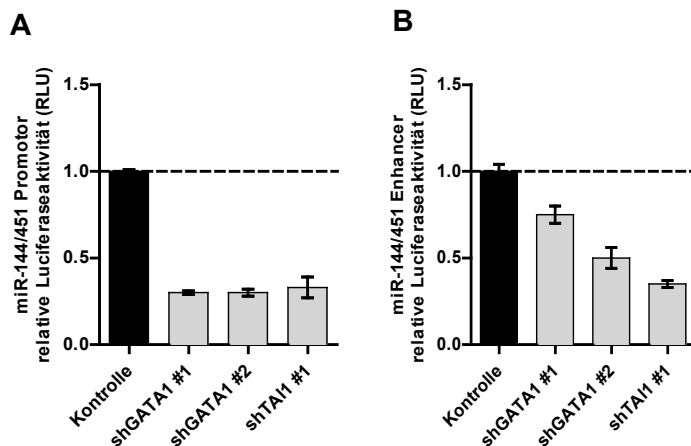


Abbildung 28: *Knockdown* von *GATA1* und *Tal1* in K562 Zellen wirkt reprimierend auf die miR-144/451 Promotor- und *Enhancer*-Aktivität.

K562 Zellen wurden sowohl mit dem Promotor- bzw. *Enhancer*-Konstrukt transfiziert als auch mit den jeweiligen *Knockdown*-Konstrukten gegen Tal1 bzw. GATA1. Nach 48h wurde die Luciferaseaktivität gemessen. Im Luciferase Assay mit K562 Zellen wird der Promotorbereich (**A**) sowie *Enhancer*-Bereich (**B**) des miR-144/451 Lokus reprimiert, wenn *GATA1* und *Tal1* Expression durch *Knockdown* herunterreguliert ist. Aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei unabhängigen Werten wurde die Standardabweichung ermittelt und als Fehlerbalken dargestellt.

#### 5.1.6. GATA1, Tal1 und RUNX1 binden im Promotor- bzw. Enhancerbereich des miR-144/451 Lokus

Nachdem der Einfluss der Transkriptionsfaktoren GATA1, Tal1 und RUNX1 auf den Promotor- bzw. *Enhancer*-Bereich in den Luciferase Assays deutlich wurde und für alle drei Transkriptionsfaktoren Bindestellen sowohl in der *Enhancer*- als auch Promotorregion *in silico* hervorgesagt wurden, sollte mittels Chromatin-Immunopräzipitation von expandierten hCD34+ Zellen eine direkte Bindung von GATA1, Tal1 sowie RUNX1 im Bereich des Promoters bzw. *Enhancers* nachgewiesen werden.

GATA1 bindet vorwiegend im *Enhancer*-Bereich des humanen miR-144/451 Lokus, ähnlich den Ergebnissen von Dore *et al.* im murinen System [7]. Für den Transkriptionsfaktor Tal1 konnte eine verstärkte Bindung im Bereich des *Enhancers* festgestellt werden, während RUNX1 bevorzugt im Promotorbereich des Lokus bindet (Abbildung 29 A-C)

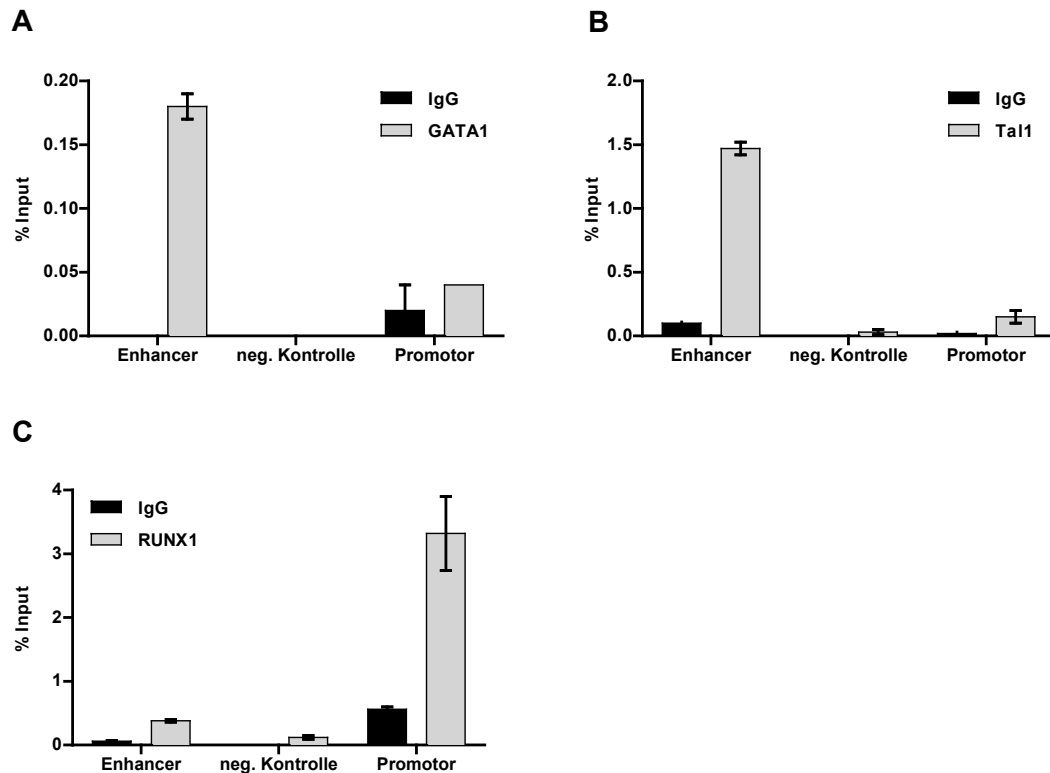


Abbildung 29: GATA1 und Tal1 binden bevorzugt in der *Enhancer*-Region, während RUNX1 verstärkt im Promotorbereich bindet in undifferenzierten hCD34+ Zellen. ChIP-Lysate von undifferenzierten hCD34+ Zellen wurden für die Chromatin-Immunopräzipitation verwendet. Die Anreicherung durch die jeweiligen Antikörper wurde mittels qRT-PCR nachgewiesen. **(A)** GATA1 bindet vermehrt im *Enhancer*-Bereich, während keine Bindung im unkonservierten Bereich (neg. Kontrolle) bzw. im Bereich des Promotors stattfindet. **(B)** Tal1-Bindung erfolgt vermehrt im *Enhancer*-Bereich, während keine Bindung im nicht konservierten Bereich (neg. Kontrolle) bzw. eine schwache Bindung im Bereich des Promotors nachgewiesen werden konnte. **(C)** Die Anreicherung von RUNX1 konnte vorwiegend im Promotorbereich nachgewiesen werden, während keine Bindung im unkonservierten Bereich (neg. Kontrolle) bzw. eine schwache Anreicherung im Bereich des *Enhancers* stattfindet. Aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei unabhängigen Werten wurde die Standardabweichung ermittelt und als Fehlerbalken dargestellt.

Für die Negativkontrolle der ChIPs wurden die Primer im nicht konservierten Bereich des miR-144/451 Locus gewählt. Als Positivkontrolle für den Tal1- bzw. RUNX1-Antikörper wurden beschriebene Bindestellen ihrer Zielgene in expandierten hCD34+ Zellen mittels qRT-PCR analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass Tal1 an den Promotorbereich seines Zielgens *Glykophorin A* bindet, während RUNX1 den Promoter seines Zielgens *CD41* okkupiert (Abbildung 30 A-B). Hiermit konnte bestätigt werden, dass das Chromatin-Immunopräzipitationsexperiment erfolgreich durchgeführt wurde.

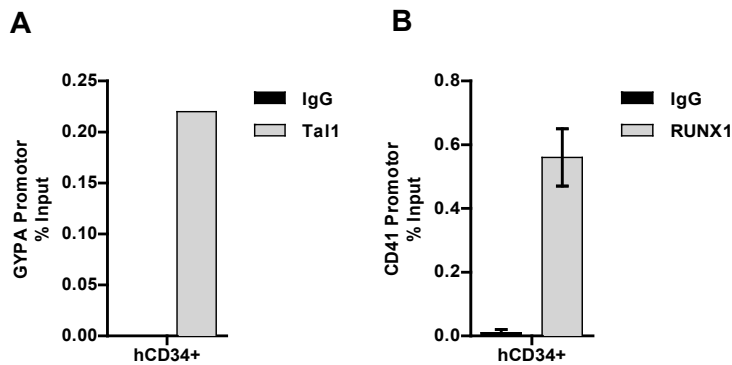


Abbildung 30: Tal1 bindet an den Promotorbereich von *Glykophorin A*, während RUNX1 im Promotorbereich von *CD41* bindet in hCD34+ Zellen.

ChIP-Lysate von undifferenzierten hCD34+ Zellen wurden für die Chromatin-Immunopräzipitation verwendet. Die Anreicherung durch die jeweiligen Antikörper wurde mittels qRT-PCR nachgewiesen. **(A)** Tal1 bindet an den *Glykophorin A* Promotor in undifferenzierten hCD34+ Zellen. **(B)** RUNX1 Anreicherung konnte am *CD41* Promotor in undifferenzierten hCD34+ Zellen nachgewiesen werden. Aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei unabhängigen Werten wurde die Standardabweichung ermittelt und als Fehlerbalken dargestellt.

### 5.1.7. Okkupation des miR-144/451 Lokus während der Differenzierung

Im Weiteren sollte analysiert werden, wie das Bindeverhalten der Transkriptionsfaktoren bzw. die Anwesenheit von Histonmodifikationen sich ändert während der Differenzierung. Hierfür wurden hCD34+ Zellen in Differenzierungsmedien kultiviert, die entweder die erythroide oder megakaryozytäre Differenzierung erlaubten.

Die Okkupation von GATA1 und Tal1 im *Enhancer*-Bereich nimmt nach der erythroiden Differenzierung (hCD34+-E) zu, während die Bindung nach einer megakaryozytären Differenzierung (hCD34+-M) im Vergleich zu den undifferenzierten, expandierten hCD34+ Zellen reduziert war. Die RUNX1-Bindung im Promotorbereich ist nach der erythroiden Differenzierung herabgesetzt, jedoch nach einer megakaryozytären Differenzierung stark erhöht (Abbildung 31 A-C). Demnach binden die erythroiden Transkriptionsfaktoren GATA1 und Tal1 verstärkt während der Erythropoese im Bereich des miR-144/451 Lokus, RUNX1-Bindung hingegen scheint während der Megakaryopoese maximal zu sein.

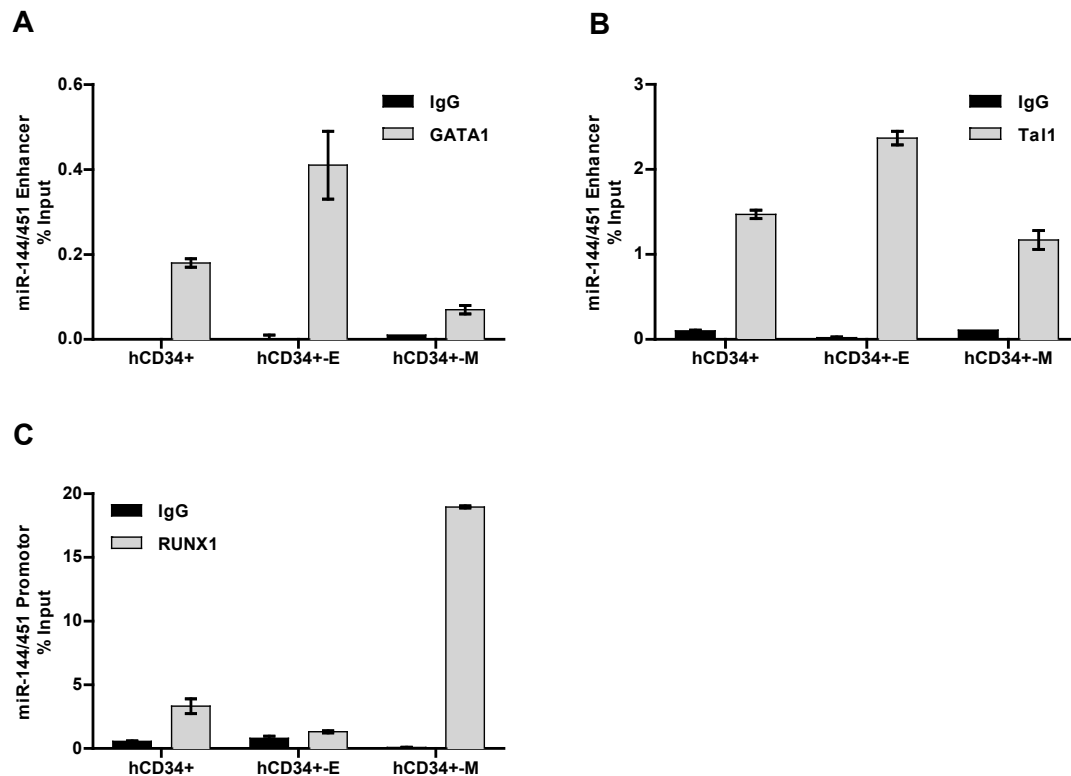


Abbildung 31: GATA1 und Tal1 Bindung steigt nach erythroider Differenzierung, während die Anreicherung von RUNX1 nach megakaryozytärer Differenzierung von hCD34+ Zellen zunimmt. ChIP-Lysate von undifferenzierten, erythroid (E) und megakaryozytär (M) differenzierten hCD34+ Zellen wurden für die Chromatin-Immunopräzipitation verwendet. Die Anreicherung durch die jeweiligen Antikörper wurde mittels qRT-PCR nachgewiesen. **(A)** GATA1 und **(B)** Tal1 Bindung an den miR-144/451 *Enhancer*-Bereich nimmt zu nach erythroider Differenzierung von hCD34+ Zellen (hCD34+-E) und sinkt im Vergleich zu undifferenzierten hCD34+ Zellen, wenn die hCD34+ Zellen der megakaryozytären Differenzierung (hCD34+-M) unterlagen. **(C)** Die Anreicherung von RUNX1 im Promotorbereich des miR-144/451 Lokus steigt nach megakaryozytärer Differenzierung und sinkt bei erythroider Differenzierung von hCD34+ Zellen. Aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei unabhängigen Werten wurde die Standardabweichung ermittelt und als Fehlerbalken dargestellt.

Neben der Okkupation der Transkriptionsfaktoren wurde auch die Veränderung der aktiven Histonmodifikationen H3K4me3 und H3K9Ac im Bereich des miR-144/451 Promotors während der Differenzierung analysiert. Nach Induktion der erythroiden Differenzierung steigt sowohl die Trimethylierung am Lysin 4 des Histon 3 (H3K4me3) als auch die Acetylierung am Lysin 9 des Histon 3 (H3K9Ac) erheblich an. Eine schwächere Steigerung dieser Modifikationen kann auch bei den megakaryozytär differenzierten hCD34+ Zellen im Vergleich zu den expandierten Zellen beobachtet werden (Abbildung 32 A-B).



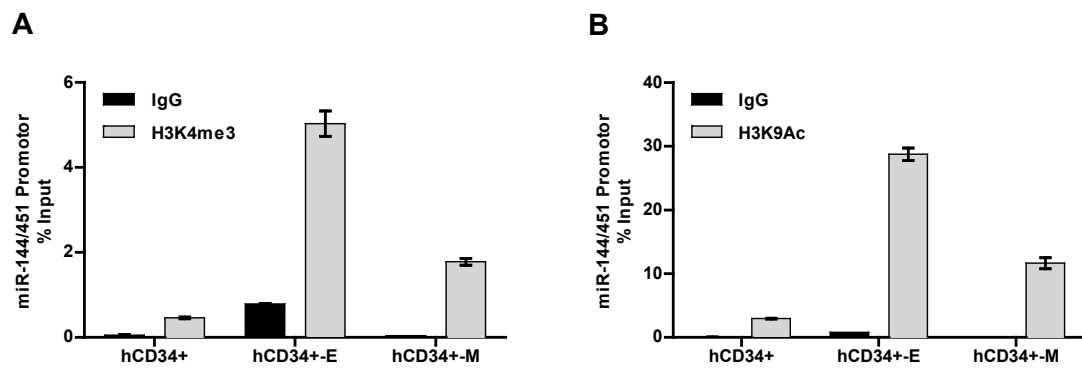


Abbildung 32: Die Anwesenheit von H3K4me3 und H3K9Ac nimmt stark zu nach erythroider Differenzierung von hCD34+ Zellen.

ChIP-Lysate von undifferenzierten, erythroid (E) und megakaryozytär (M) differenzierten hCD34+ Zellen wurden für die Chromatin-Immunopräzipitation verwendet. Die Anreicherung durch die jeweiligen Antikörper wurde mittels qRT-PCR nachgewiesen. Die Anwesenheit der Histonmodifikationen H3K4me3 (**A**) sowie H3K9Ac (**B**) ist stark erhöht in hCD34+ Zellen nach Induktion der erythroiden Differenzierung (hCD34+-E), aber auch leicht nach der megakaryozytären Differenzierung (hCD34+-M). Aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei unabhängigen Werten wurde die Standardabweichung ermittelt und als Fehlerbalken dargestellt.

Der Anstieg dieser beiden Histonmodifikationen, die für einen transkriptionell aktiven Chromatinbereich sorgen, stimmt mit den zuvor dargestellten Expressionsdaten der miR-144/451 überein. Somit ist das Chromatin im Bereich des miR-144/451 Lokus zugänglich bei erythroider Differenzierung und dies resultiert in einer gesteigerten Expression des miR-144/451 Clusters während der Erythropoese.

## 5.2. miR-451 in RUNX1-ETO exprimierenden Zellen

### 5.2.1. RUNX1-ETO reprimiert die erythroide Differenzierung

In der Literatur wurde unter anderem beschrieben, dass bei Patienten des AML FAB M2-Typs, die das leukämische Fusionsprotein RUNX1-ETO exprimieren, die erythroide Differenzierung gestört bzw. blockiert ist [209, 210]. Dies führt zu einer Anreicherung von unreifen Vorläuferzellen im Knochenmark der Patienten. Da die miR-451 an der erythroiden Differenzierung von Stammzellen beteiligt ist, sollte im nachfolgenden evaluiert werden, ob RUNX1-ETO einen Einfluss auf die Expression der miR-451 bzw. auf das Cluster miR-144/451 hat.

Für die Experimente mit dem RUNX1-ETO Fusionsprotein bzw. dessen trunkierte Form, wurden humane Zelllinien sowie hämatopoetische Stammzellen lentiviral transduziert, sodass *RUNX1-ETO* bzw. *RUNX1-ETOftr* überexprimiert wurden. Die Überexpression auf Proteinebene konnte im Westernblot nachgewiesen werden (Abbildung 33). In den Kontrollzellen, die nur mit dem Leervektor transfiziert wurden, war keine Bande durch den HA-Tag Antikörper sichtbar. Jedoch in den mit *RUNX1-ETO* bzw. *RUNX1-ETOftr* transfizierten

Zelllysaten konnte der HA-Tag, der der *RUNX-ETO* Sequenz vorgeschaltet ist, nachgewiesen werden. RUNX1-ETO weist mit dem HA-Tag zusammen eine Masse von etwa 88 kDa auf bzw. die trunkierte Form 66 kDa. Lamin B1 besitzt eine Masse von 66 kDa und diente als Ladekontrolle.

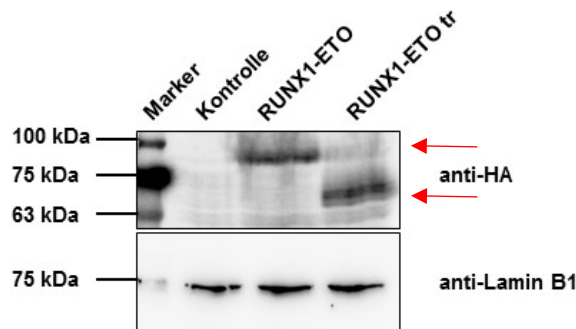


Abbildung 33: Kontrolle der Überexpression von RUNX1-ETO und RUNX1-ETOtr in HEK293T Zellen mittels Westernblot.

Proteinlysate transfizierter HEK293T Zellen wurden elektrophoretisch aufgetrennt. In folgender Reihenfolge erfolgte die Auftragung: Spur 1: Marker, Spur 2: Lysat der Kontrollzellen, die mit dem Leervektor transfiziert waren, Spur 3: Lysat der RUNX1-ETO exprimierenden Zellen, Spur 4: Lysat der RUNX1-ETOtr exprimierenden Zellen. Im oberen Abschnitt erfolgte die Inkubation mit einem HA-Tag Antikörper zur Visualisierung des HA-getaggen RUNX1-ETO und im unteren Abschnitt mit einem Lamin B1 Antikörper als Ladekontrolle. RUNX1-ETO konnte mit einer Masse von 88 kDa in der Spur 3 nachgewiesen werden, während der Nachweis von RUNX1-ETOtr mit 66 kDa in Spur 4 erfolgreich war. Im unteren Abschnitt konnte Lamin B1 mit einer Masse von 66 kDa in allen Zelllysaten gleich intensiv nachgewiesen werden.

Zunächst wurde die Expression erythroider Gene in K562 Zellen, die mit *RUNX1-ETO* transduziert wurden, analysiert. Hierbei wurde deutlich, dass RUNX1-ETO sowie dessen trunkierte Form die Expression von  $\alpha$ -Globin sowie *KLF1* herabregulieren (Abbildung 34 A-B). Für die Expression von *Glykophorin A* konnte diese Repression noch deutlicher gezeigt werden. Trotz der Induktion erythroider Differenzierung mittels Hemin, woraufhin die Expression von *GYP A* stark anstieg, war die Expression stark reprimiert in den Zellen, die *RUNX1-ETO* exprimierten (Abbildung 34 C). RUNX1-ETO und RUNX1-ETOtr beeinflussten auch die Expression des erythroiden Oberflächenmarkers *CD71* negativ. Dies konnte in mehreren Messungen mittels FACS nachgewiesen werden. Exemplarisch ist eine *CD71*-Messung von RUNX1-ETO bzw. RUNX1-ETOtr exprimierenden K562 Zellen in Abbildung 34 D dargestellt.

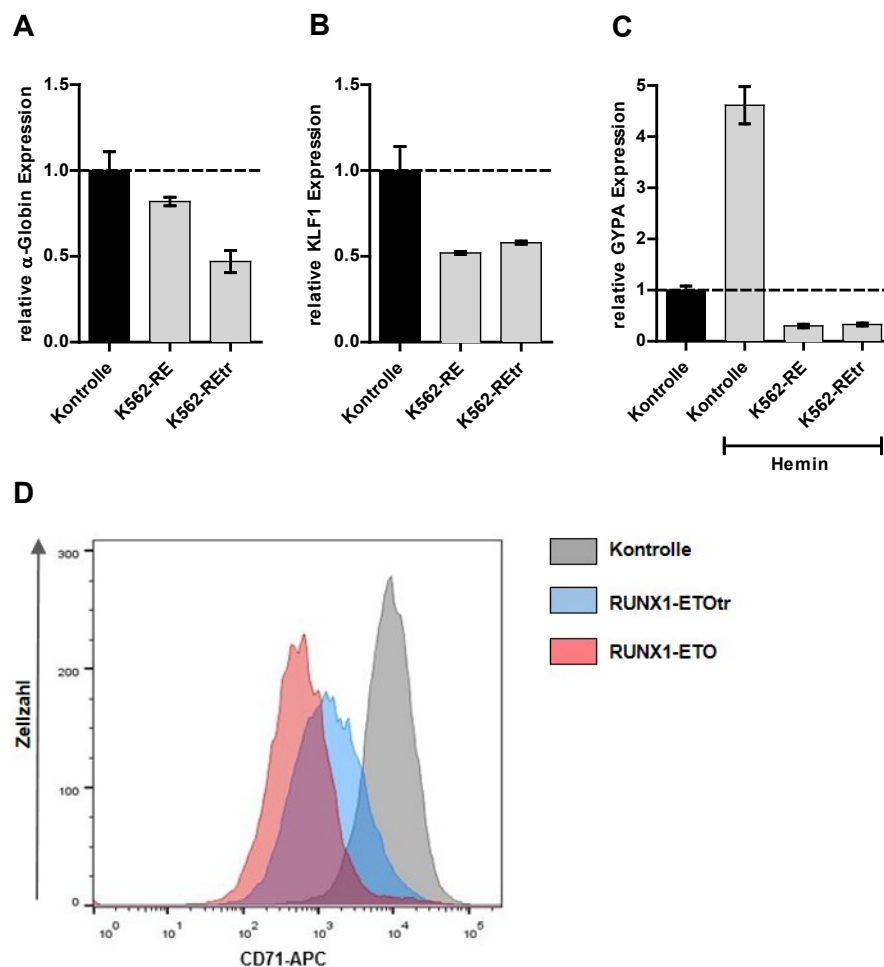


Abbildung 34: RUNX1-ETO (RE) und RUNX1-ETOTR (REtr) reprimieren die Expression der erythroiden Gene  $\alpha$ -Globin, KLF1, GYPA sowie CD71 in K562 Zellen. K562 Zellen wurden lentiviral mit RUNX1-ETO bzw. RUNX1-ETOTR Überexpressionskonstrukten transduziert und die Expression mittels qRT-PCR nachgewiesen bzw. die Exposition von CD71 auf der Zelloberfläche mittels FACS. **(A)** Überexpression von RUNX1-ETO bzw. RUNX1-ETOTR führt zur Herabregulation der  $\alpha$ -Globin Expression. **(B)** Die Expression von KLF1 ist reprimiert bei Überexpression von RUNX1-ETO bzw. RUNX1-ETOTR. **(C)** K562 Zellen wurden mit RUNX1-ETO bzw. RUNX1-ETOTR transduziert und mit Hemin behandelt. In der behandelten Leervektorkontrolle steigt die Expression von GYPA stark an, während die GYPA Expression erheblich reprimiert ist, wenn RUNX1-ETO bzw. RUNX1-ETOTR vorhanden ist. Aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei unabhängigen Werten wurde die Standardabweichung ermittelt und als Fehlerbalken dargestellt. **(D)** Mittels FACS wurde die Anwesenheit von CD71 auf der Zelloberfläche der transduzierten K562 Zellen bestimmt. Die Kontrolle (grau) weist eine erheblich größere Anzahl an CD71 positiven Zellen auf als die RUNX1-ETO (rot) und RUNX1-ETOTR (blau) exprimierenden K562 Zellen.

Um auszuschließen, dass dieser repressive Effekt von RUNX1-ETO und RUNX1-ETOTR nur in der einen verwendeten Zelllinie K562 vorliegt, wurden sowohl TF1 als auch hCD34+ Zellen mit den beiden Überexpressionskonstrukten transduziert.

Die starke Reprimierung der Expression von Glykophorin A und CD71 durch beide RUNX1-ETO Konstrukte konnte sowohl auf mRNA- (Abbildung 35 A-B) als auch auf Proteinebene mittels FACS (Abbildung 35 C-D) für TF-1 Zellen aufgezeigt werden. Während auf der einen Seite durch die Anwesenheit von RUNX1-ETO (tr) die Anzahl GYPA-positiver Zellen abnimmt, reduziert sich bei CD71 erheblich die Anwesenheit des Proteins auf allen Zellen.

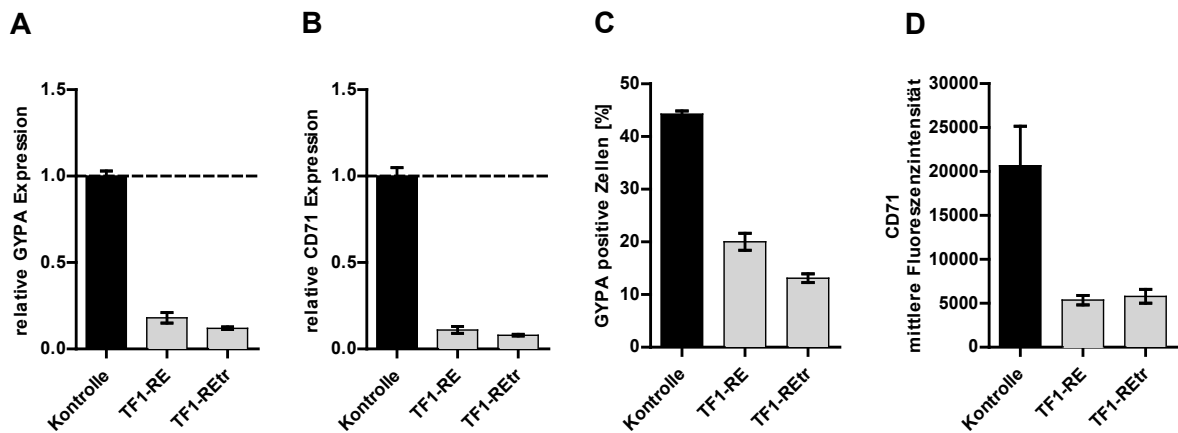
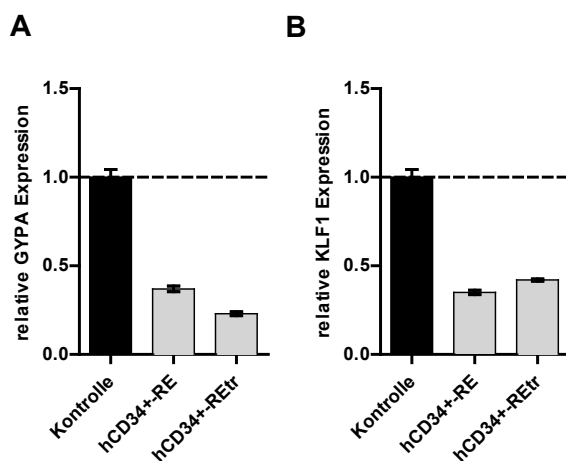


Abbildung 35: Überexpression von *RUNX1-ETO* (RE) und *RUNX1-ETOtr* (REtr) in TF-1 Zellen reprimierte die Expression von *Glykophorin A* sowie von *CD71*.

TF-1 Zellen wurden lentiviral mit *RUNX1-ETO* bzw. *RUNX1-ETOtr* Überexpressionskonstrukten transduziert und die Expression mittels qRT-PCR nachgewiesen. **(A)** Überexpression von *RUNX1-ETO* bzw. *RUNX1-ETOtr* in TF-1 Zellen führt zu einer starken Herunterregulation der *GYPA* Expression. **(B)** Überexpression von *RUNX1-ETO* und *RUNX1-ETOtr* reprimierte die Expression von *CD71* erheblich. **(C)** Die Anzahl *GYPA* positiver Zellen ist deutlich vermindert nach Überexpression von *RUNX1-ETO* und *RUNX1-ETOtr*. **(D)** In *RUNX1-ETO* und *RUNX1-ETOtr* überexprimierenden TF-1 Zellen ist die mittlere Fluoreszenzintensität des *CD71* stark vermindert. Aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei unabhängigen Werten wurde die Standardabweichung ermittelt und als Fehlerbalken dargestellt.

Die Expression der erythroiden Gene *GYPA* und *KLF1* ist in hCD34+ Zellen, die *RUNX1-ETO* bzw. *RUNX1-ETOtr* exprimieren, erheblich reduziert (Abbildung 36 A-B). Darüber hinaus konnte in Koloniebildenden Wachstumsexperimenten mit transduzierten hCD34+ Zellen gezeigt werden, dass durch die Anwesenheit von *RUNX1-ETO* bzw. *RUNX1-ETOtr* die Differenzierung dieser Stammzellen stark gestört ist. Die *RUNX1-ETO* (*tr*) exprimierenden Zellen wiesen deutlich weniger Kolonien auf im Vergleich zur Kontrolle und der Anteil erythroider Kolonien ist zudem erheblich reduziert (Abbildung 36 C-D).



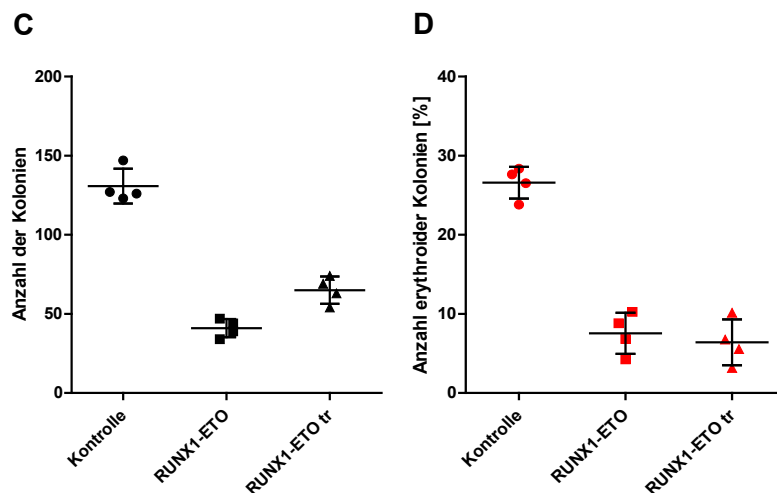


Abbildung 36: Überexpression von *RUNX1-ETO* (RE) und *RUNX1-ETOftr* (REtr) in hCD34+ Zellen reprimiert die Expression von *Glykophorin A* sowie von *KLF1* und die Ausprägung erythroider Kolonien im CFU-Assay. hCD34+ Zellen wurden lentiviral mit *RUNX1-ETO* bzw. *RUNX1-ETOftr* Überexpressionskonstrukten transduziert. Die Expression wurde mittels qRT-PCR nachgewiesen bzw. die Anzahl der Kolonien im CFU-Assay mikroskopisch bestimmt. **(A)** Überexpression von *RUNX1-ETO* bzw. *RUNX1-ETOftr* in hCD34+ Zellen führt zu einer starken Herunterregulation der *GYP A* Expression. **(B)** Überexpression von *RUNX1-ETO* und *RUNX1-ETOftr* reprimiert die Expression von *KLF1*. **(C)** Die Anzahl an Kolonien im CFU-Assay ist deutlich vermindert nach Überexpression von *RUNX1-ETO* und *RUNX1-ETOftr*. **(D)** Der Anteil erythroider Kolonien in den *RUNX1-ETO* (tr) überexprimierenden hCD34+ Zellen im CFU-Assay ist deutlich vermindert. Aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei unabhängigen Werten wurde die Standardabweichung ermittelt und als Fehlerbalken dargestellt.

Um zu analysieren, ob *RUNX1-ETO* direkt die Expression der Gene *GYP A* und *KLF1* beeinflusst, wurden ChIP-Assays mit *RUNX1-ETO* und *RUNX1-ETOftr* exprimierenden K562 sowie hCD34+ Zellen durchgeführt. Auf diese Weise kann eine Bindung von *RUNX1-ETO* an die spezifischen Promotorbereiche und somit direkte Beeinflussung deren Aktivität nachgewiesen werden.

In den nachfolgenden ChIP-Experimenten konnte eine Anreicherung sowohl von *RUNX1-ETO* als auch *RUNX1-ETOftr* im Promotorbereich des *Glykophorin A* Lokus in K562 sowie hCD34+ Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 37 A-C). Für den Promotorbereich des *KLF1* Gens konnten diese Anreicherungen ebenfalls in beiden Zellsystemen beobachtet werden (Abbildung 37 D-F). Somit okkupierten *RUNX1-ETO* sowie *RUNX1-ETOftr* die Promotorbereiche dieser erythroiden Gene, wodurch deren Expression reprimiert werden konnte.

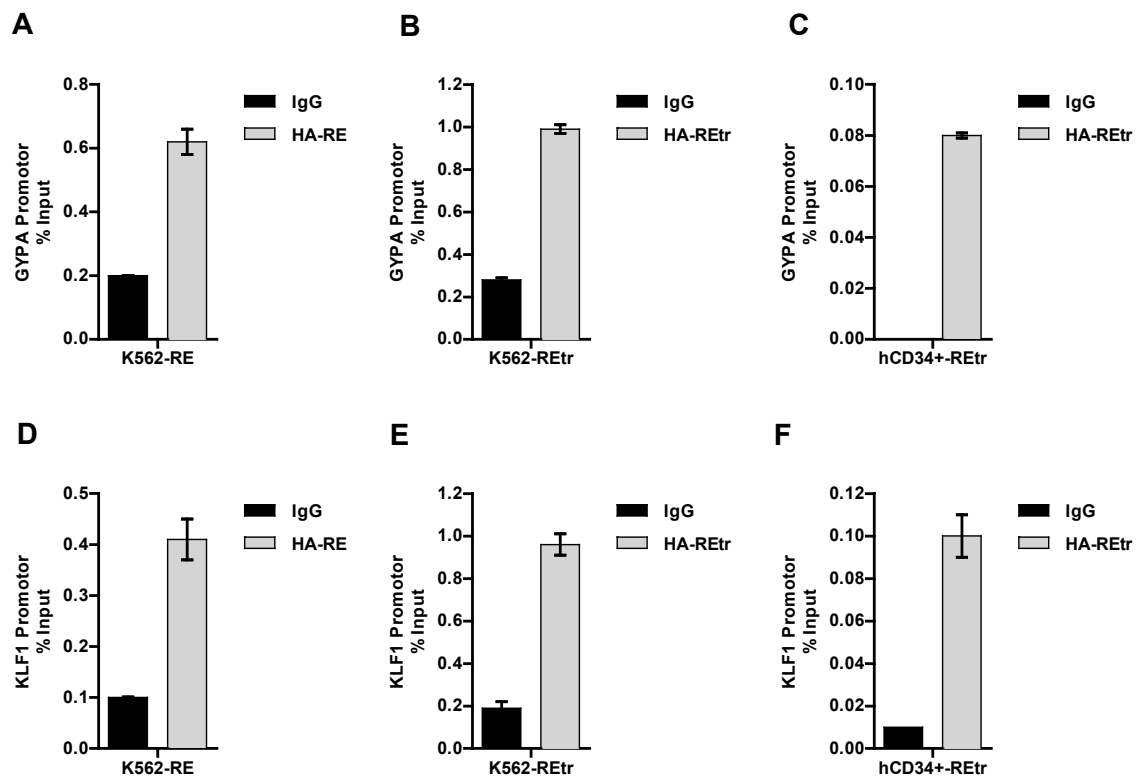


Abbildung 37: RUNX1-ETO (RE) und RUNX1-ETOr (REtr) binden an die Promotorbereiche von *Glykophorin A* und *KLF1* in K562 und hCD34+ Zellen im ChIP-Assay. ChIP-Lysate von K562 Zellen, die lentiviral mit *RUNX1-ETO* bzw. *RUNX1-ETOr* transduziert worden waren, wurden für die Chromatin-Immunopräzipitation verwendet. Die Anreicherung durch den HA-Tag Antikörper wurde mittels qRT-PCR nachgewiesen. (A) RUNX1-ETO bindet an den *Glykophorin A* Promotor in K562 Zellen. (B) RUNX1-ETOr bindet an den *Glykophorin A* Promotor in K562 Zellen. (C) In hCD34+ Zellen okkupiert RUNX1-ETOr den *Glykophorin A* Promotor. (D) RUNX1-ETO bindet an den *KLF1* Promotor in K562 Zellen. (E) RUNX1-ETOr okkupiert den *KLF1* Promotor in K562 Zellen. (F) In hCD34+ Zellen bindet RUNX1-ETOr den *KLF1* Promotor. Aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei unabhängigen Werten wurde die Standardabweichung ermittelt und als Fehlerbalken dargestellt.

### 5.2.2. RUNX1-ETO reprimiert die Expression der miR-451

Nachdem in den verwendeten Zellmodellen bestätigt werden konnte, dass RUNX1-ETO die Expression erythroider Gene reprimiert und darüber hinaus in Stammzellexperimenten die Differenzierung gänzlich stört, sollte nachfolgend analysiert werden, ob RUNX1-ETO sowie RUNX1-ETOr ebenso die Expression der miR-451 negativ beeinflusst. Hierfür wurden K562, TF-1 sowie hCD34+ Zellen mit *RUNX1-ETO* bzw. *RUNX1-ETOr* transduziert und anschließend die Expression des Clusters miR-144/451 analysiert. Es konnte sowohl in den verwendeten Zelllinien K562 bzw. TF-1 als auch in den humanen CD34+ Zellen gezeigt werden, dass durch die Überexpression von *RUNX1-ETO* und *RUNX1-ETOr* die miR-144/451 Expression stark herunterreguliert wurde (Abbildung 38 A-C).

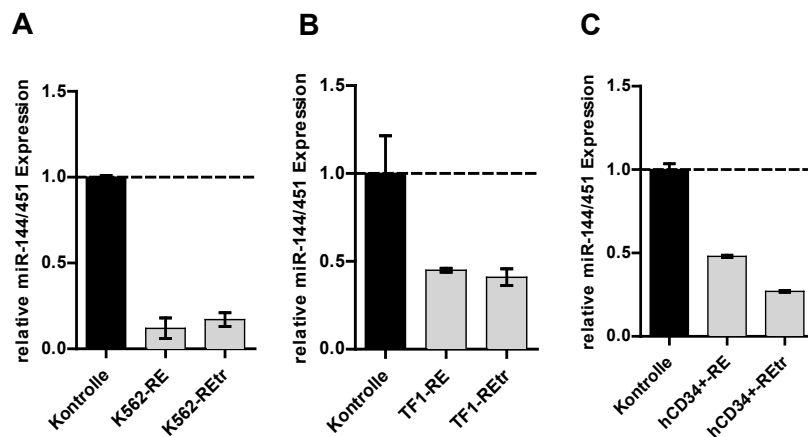


Abbildung 38: Überexpression von *RUNX1-ETO* (RE) und *RUNX1-ETOtr* (REtr) in K562, TF-1 und hCD34+ Zellen reprimiert die Expression des miR-144/451 Clusters. K562, TF-1 und hCD34+ Zellen wurden lentiviral mit *RUNX1-ETO* bzw. *RUNX1-ETOtr* Überexpressionskonstrukten transduziert. Die Expression wurde mittels qRT-PCR nachgewiesen. Die Überexpression von *RUNX1-ETO* bzw. *RUNX1-ETOtr* führt in K562 (A), TF-1 (B) und hCD34+ Zellen (C) zu einer Herunterregulation der miR-144/451 Expression. Aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei unabhängigen Werten wurde die Standardabweichung ermittelt und als Fehlerbalken dargestellt.

Im nachfolgenden Experiment sollte dieser repressive Effekt von *RUNX1-ETO* rückgängig gemacht werden. Hierfür wurden zunächst K562 Zellen mit *RUNX1-ETOtr* transduziert. Die Zellen, die nachweislich *RUNX1-ETOtr* exprimierten, wurden daraufhin mit den *RUNX1-ETO Knockdown*-Konstrukten erneut transduziert. Nach erfolgreicher Selektion wurde die Expression von *RUNX1-ETOtr* überprüft. Ein etwa 50%-iger *Knockdown* im Vergleich zu den *RUNX1-ETOtr* überexprimierenden Zellen konnte erreicht werden (Abbildung 39 A). Der *Knockdown* von *RUNX1-ETOtr* resultierte in einer erhöhten Expression des erythroiden Gens *CD71* und dem miR-144/451 Cluster (Abbildung 39 B-C). Somit konnte die Repression der erythroiden Gene wieder zum Teil aufgehoben werden.

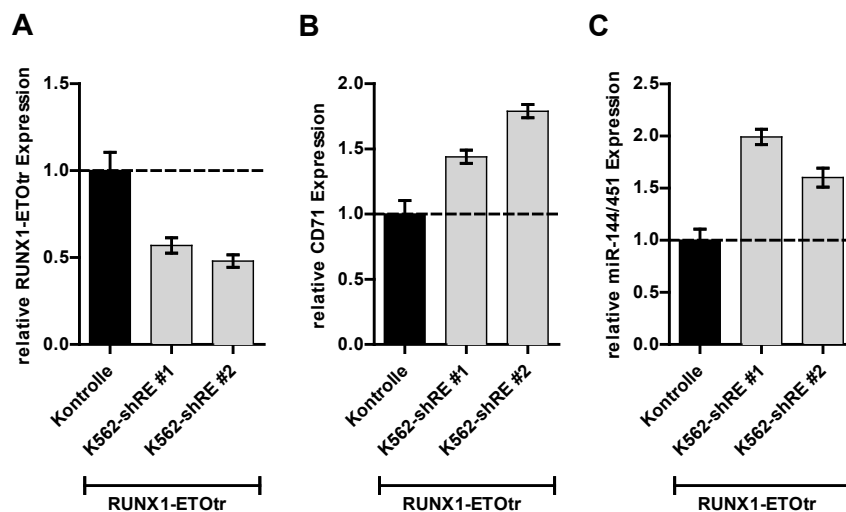


Abbildung 39: *Knockdown* von *RUNX1-ETOtr* in *RUNX1-ETOtr* überexprimierenden K562 Zellen erhöht die Expression von *CD71* sowie des Clusters miR-144/451.

K562 Zellen wurden lentiviral zunächst mit dem *RUNX1-ETOr* Überexpressionskonstrukt transduziert. Die positiv transduzierten Zellen wurden mittels FACS von den nicht transduzierten Zellen getrennt und anschließend mit den *Knockdown*-Konstrukten gegen *RUNX1-ETO* erneut transduziert. Die Expression wurde mittels qRT-PCR nachgewiesen. **(A)** Kontrolle des *Knockdown* von *RUNX1-ETOr* in *RUNX1-ETOr* überexprimierenden K562 Zellen. **(B)** *Knockdown* von *RUNX1-ETOr* führt zu einer gesteigerten Expression von *CD71*. **(C)** Expression des miR-144/451 Clusters ist hochreguliert nach *Knockdown* von *RUNX1-ETOr*. Aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei unabhängigen Werten wurde die Standardabweichung ermittelt und als Fehlerbalken dargestellt.

Zur Kontrolle wurde die Überexpression von *RUNX1-ETOr* sowie die Expression von *CD71* und miR-144/451 in den einfach transduzierten K562 Zellen, die nur *RUNX1-ETOr* exprimierten, auf mRNA-Ebene nachgewiesen. Während *RUNX1-ETOr* überexprimiert wird, ist die Expression von *CD71* bzw. dem Cluster miR-144/451 reprimiert (Abbildung 40 A-C).

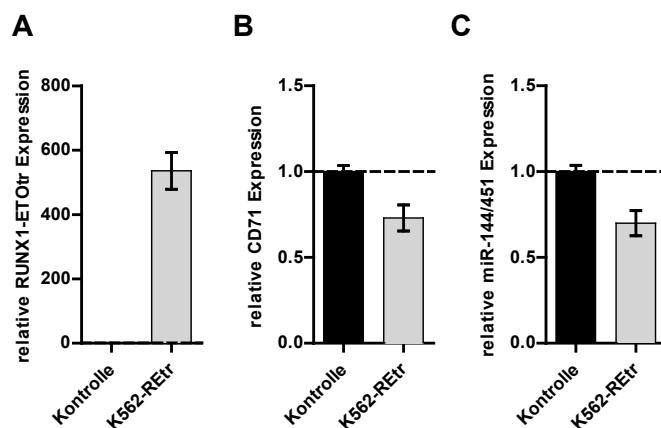


Abbildung 40: Überexpression von *RUNX1-ETOr* in K562 Zellen reprimiert die Expression von *CD71* sowie des Clusters miR-144/451.

K562 Zellen wurden lentiviral mit dem *RUNX1-ETOr* Überexpressionskonstrukt transduziert. Die Expression wurde mittels qRT-PCR nachgewiesen. **(A)** Kontrolle der Überexpression von *RUNX1-ETOr* in K562 Zellen. **(B)** Überexpression von *RUNX1-ETOr* führt zu einer reprimierten Expression von *CD71*. **(C)** Expression des miR-144/451 Clusters ist herunterreguliert nach Überexpression von *RUNX1-ETOr*. Aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei unabhängigen Werten wurde die Standardabweichung ermittelt und als Fehlerbalken dargestellt.

Für die Expression der reifen miR-451 konnte in diesem Zellsystem ebenfalls gezeigt werden, dass die Überexpression des trunkierten *RUNX1-ETOs* die Expression der miR-451 reprimiert. Jedoch führt ein erneuter *Knockdown* von *RUNX1-ETOr* wieder zu einem leichten Anstieg der miR-451 Expression (Abbildung 41 A-B).



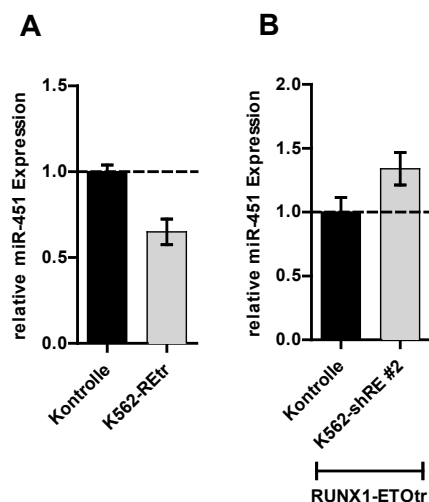


Abbildung 41: Überexpression von *RUNX1-ETotr* in K562 Zellen reprimiert die miR-451 Expression, während erneuter *Knockdown* die miR-451 Expression steigert.

K562 Zellen wurden lentiviral zunächst mit dem *RUNX1-ETotr* Überexpressionskonstrukt transduziert. Die positiv transduzierten Zellen wurden mittels FACS von den nicht transduzierten Zellen getrennt und anschließend mit den *Knockdown*-Konstrukten gegen *RUNX1-ETO* erneut transduziert. Die Expression wurde mit Hilfe des miscript.-Systems mittels qRT-PCR nachgewiesen. (A) Überexpression von *RUNX1-ETotr* in K562 Zellen reprimiert die miR-451 Expression. (B) Ein anschließender *Knockdown* von *RUNX1-ETotr* führt zu einer erhöhten Expression der miR-451. Aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei unabhängigen Werten wurde die Standardabweichung ermittelt und als Fehlerbalken dargestellt.

Darüber hinaus konnte das Experiment in hCD34+ Zellen, die sowohl *RUNX1-ETotr* als auch *cKit* überexprimierten, erfolgreich wiederholt werden (Abbildung 42). Ein *Knockdown* von *RUNX1-ETO* konnte mit beiden shRNA Konstrukten erreicht werden (Abbildung 43 A), wodurch die Expression von *CD71* und dem miR-144/451 Cluster steigt (Abbildung 43 B-C).

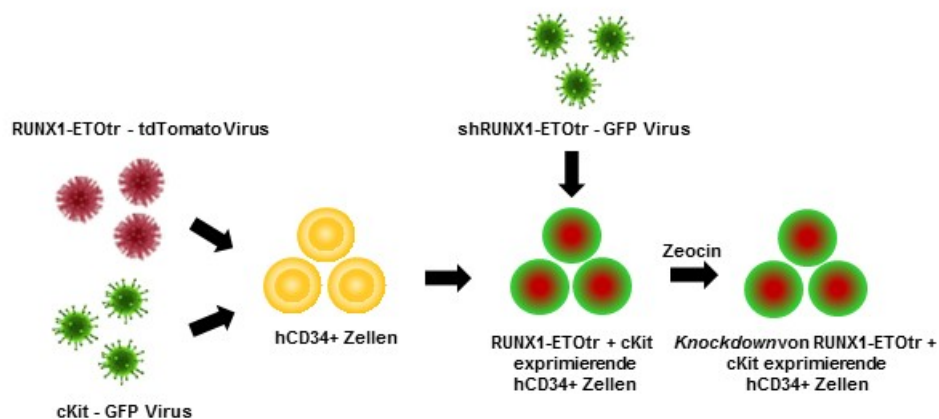


Abbildung 42: Schematische Darstellung der doppelten Transduktion der hCD34+ Zellen mit cKit sowie *RUNX1-ETotr*

hCD34+ Zellen werden mit Viren transduziert, die entweder für *RUNX1-ETO* oder *cKit* kodieren. Anhand der Expression der Reportergene tdTomato und GFP werden die doppelt positiven hCD34+ Zellen mittels *cell sorting* selektiert. Anschließend werden die Zellen mit *Knockdown*-Konstrukten gegen *RUNX1-ETotr* transduziert und mittels Zeocin selektiert.

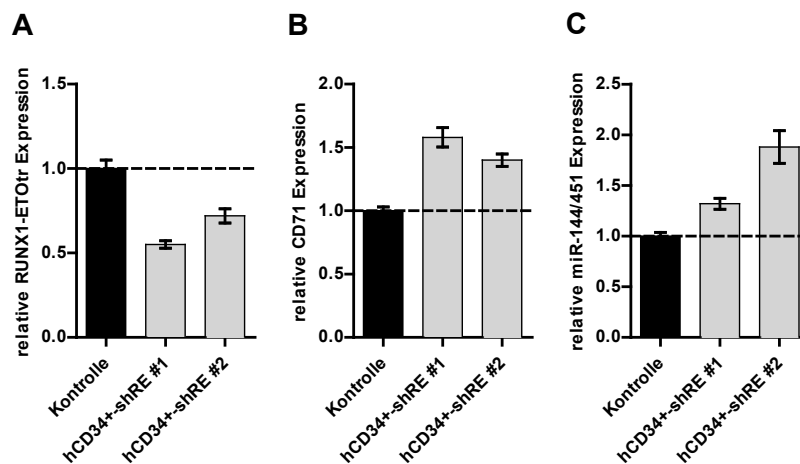


Abbildung 43: *Knockdown* von *RUNX1-ETOTr* in *RUNX1-ETOTr* und *cKit* überexprimierenden hCD34+ Zellen erhöht die Expression von *CD71* sowie des Clusters miR-144/451.

hCD34+ Zellen wurden zunächst mit einem *cKit* sowie *RUNX1-ETOTr* Überexpressionskonstrukt transduziert. Die positiv transduzierten Zellen wurden anschließend mit den *Knockdown*-Konstrukten gegen *RUNX1-ETOTr* in *RUNX1-ETOTr* und *cKit* überexprimierenden hCD34+ Zellen. Expression von *RUNX1-ETOTr* ist vermindert. (B) *Knockdown* von *RUNX1-ETOTr* führt zu einer gesteigerten Expression von *CD71*. (C) Expression des miR-144/451 Clusters ist hochreguliert nach *Knockdown* von *RUNX1-ETOTr*. Aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei unabhängigen Werten wurde die Standardabweichung ermittelt und als Fehlerbalken dargestellt.

### 5.2.3. RUNX1-ETO reprimiert die Promotor- und Enhanceraktivität des miR-144/451 Clusters

Nachdem in den Expressionsanalysen der repressive Effekt von RUNX1-ETO und RUNX1-ETOTr auf die Expression erythroider Gene sowie des miR-144/451 Clusters deutlich wurde und RUNX1-ETO über die RUNT-Domäne an DNA-Sequenzen binden kann, sollte im Weiteren untersucht werden, ob RUNX1-ETO einen Effekt auf die Aktivität des *Enhancers* bzw. Promotors des miR-144/451 Lokus im Luciferase Assay in K562 Zellen ausübt. Es konnte gezeigt werden, dass RUNX1-ETO und dessen trunkierte Form sowohl die Aktivität des Promotors (Abbildung 44 A) als auch die des *Enhancers* (Abbildung 44 B) erheblich reprimiert.

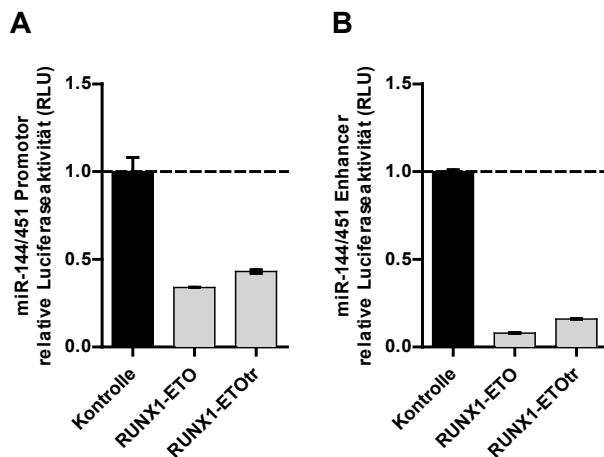


Abbildung 44: RUNX1-ETO und RUNX1-ETOr wirken reprimierend auf die Aktivität des miR-144/451 Promotor- und Enhancerbereichs in K562 Zellen.

K562 Zellen wurden sowohl mit dem Promotor- bzw. *Enhancer*-Konstrukt transfiziert als auch mit *RUNX1-ETO* bzw. *RUNX1-ETOr*. Nach 48h wurde die Luciferaseaktivität gemessen. Im Luciferase Assay mit K562 Zellen reprimieren RUNX1-ETO und RUNX1-ETOr die Aktivität des Promotor- (**A**) sowie des *Enhancer*-Bereiches (**B**) des miR-144/451 Lokus. Aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei unabhängigen Werten wurde die Standardabweichung ermittelt und als Fehlerbalken dargestellt.

#### 5.2.4. RUNX1-ETO (tr) okkupiert die Promotorregion des miR-144/451 Lokus

Wie schon erwähnt kann RUNX1-ETO über die RUNT-Domäne an DNA-Sequenzen mit RUNX1-Bindemotiven binden. Da zuvor gezeigt werden konnte, dass RUNX1 im Bereich des Promotors an den miR-144/451 Lokus bindet, wurde nachfolgend untersucht, ob RUNX1-ETO bzw. RUNX1-ETOr ebenfalls über diese Fähigkeit verfügt.

Zunächst wurden ChIP-Assays mit K562 und hCD34+ Zellen durchgeführt, die *RUNX1-ETO* bzw. *RUNX1-ETOr* exprimierten. Hierbei konnte nachgewiesen werden, dass sowohl RUNX1-ETO als auch RUNX1-ETOr im Promotorbereich des miR-144/451 Lokus in beiden Zellsystemen binden (Abbildung 45 A-C).

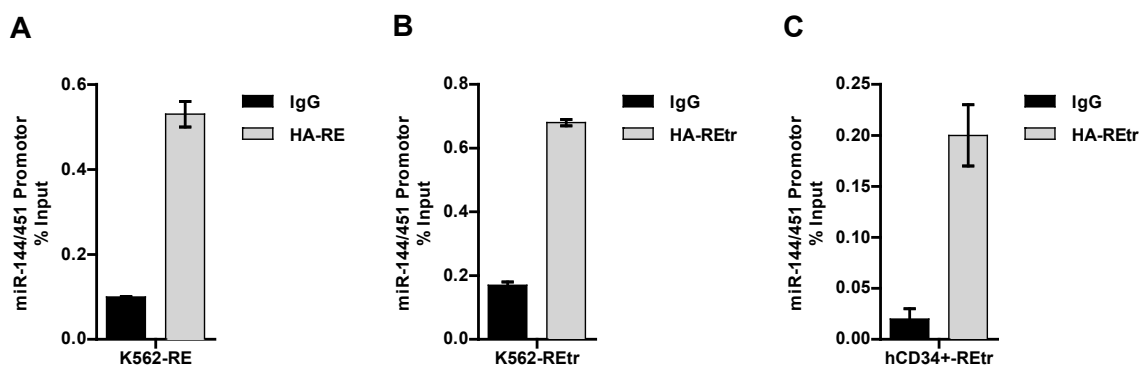


Abbildung 45: RUNX1-ETO (RE) und RUNX1-ETOr (REtr) binden an die Promotorregion des miR-144/451 Lokus in K562 und hCD34+ Zellen im ChIP-Assay.

ChIP-Lysate von K562 und hCD34+ Zellen, die lentiviral mit *RUNX1-ETO* bzw. *RUNX1-ETOr* transduziert worden waren, wurden für die Chromatin-Immunopräzipitation verwendet. Die Anreicherung durch den HA-Tag Antikörper wurde mittels qRT-PCR nachgewiesen. (**A**) RUNX1-ETO bindet an den miR-144/451 Promotor in K562 Zellen. (**B**)

RUNX1-ETOr okkupiert den miR-144/451 Promotor in K562 Zellen. **(C)** In hCD34+ Zellen bindet RUNX1-ETOr an den Promotorbereich des miR-144/451 Lokus. Aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei unabhängigen Werten wurde die Standardabweichung ermittelt und als Fehlerbalken dargestellt.

Da es sich bei den bisherigen Experimenten um Überexpressionen des Fusionsproteins handelt, wurden nachfolgend in Kasumi-1 Zellen, die *RUNX1-ETO* endogen exprimieren, ChIP-Assays durchgeführt. Hierfür wurde der ETO-Antikörper verwendet, da dieser in der Lage ist im Bereich der ETO-Region des Proteins zu binden. Da Proteine der ETO-Familie über keine direkte DNA-Bindedomäne verfügen, sondern nur in Komplexen mit deren Cofaktoren vorliegen, sollte die erreichte Anreicherung nur durch RUNX1-ETO resultieren. Dennoch wurde zur Kontrolle der gleiche ChIP-Assay mit dem ETO-Antikörper in K562 Wildtypzellen durchgeführt. Diese exprimieren ETO-Proteine jedoch kein RUNX1-ETO.

Wie in der nachfolgenden Abbildung deutlich zu sehen ist, konnte mit dem ETO-Antikörper in K562 Zellen keine Anreicherung auf dem miR-144/451 Promotor nachgewiesen werden (Abbildung 46 A). In den Kasumi-1 Zellen hingegen war dieses mit Hilfe des ETO-Antikörpers möglich. Somit konnte in diesen Zellen eine Okkupation von endogenem RUNX1-ETO im Bereich des Promotors des miR-144/451 Lokus bewiesen werden (Abbildung 46 B).

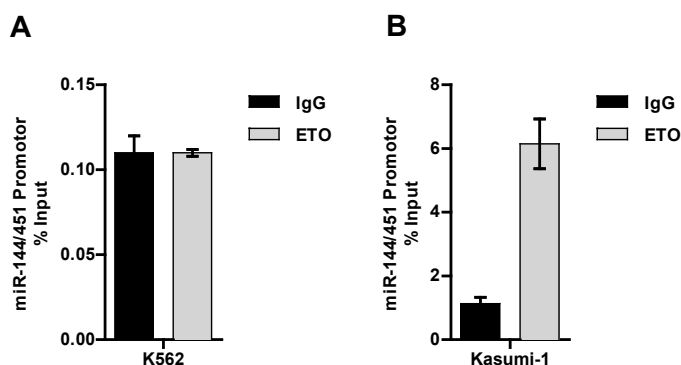


Abbildung 46: Endogenes RUNX1-ETO okkupiert die Promotorregion des miR-144/451 Lokus in Kasumi-1 Zellen im ChIP-Assay.

ChIP-Lysate von K562 bzw. Kasumi-1 Zellen wurden für die Chromatin-Immunopräzipitation verwendet. Die Anreicherung durch den ETO- Antikörper wurde mittels qRT-PCR nachgewiesen. **(A)** Es konnte keine Anreicherung an den miR-144/451 Promotor in K562 Zellen nachgewiesen werden. **(B)** Endogenes RUNX1-ETO okkupiert den Promotorbereich des miR-144/451 Lokus in Kasumi-1 Zellen. Aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei unabhängigen Werten wurde die Standardabweichung ermittelt und als Fehlerbalken dargestellt.

### 5.2.5. RUNX1-ETOr Bindung an den Promotorbereich des miR-144/451 Lokus beeinflusst dessen Epigenetik

RUNX1-ETOr ist wie RUNX1-ETO in der Lage an den Promotorbereich des miR-144/451 Lokus zu binden und über die verschiedenen Bindestellen im ETO-Teil des Proteins Cofaktoren zu rekrutieren. Dies würde unter anderem die Histonmodifikationen beeinflussen, wodurch die reprimierte Expression des miR-144/451 Clusters erklärt werden könnte. Um diese Hypothese zu beweisen, wurden ChIP-Assays in K562 Zellen, die als Kontrolle nur den

Leervektor enthielten oder aber *RUNX1-ETotr* exprimierten, durchgeführt. Zunächst konnte beobachtet werden, dass in Anwesenheit von *RUNX1-ETotr* sowohl die Anreicherung von GATA1 im Enhancerbereich des miR-144/451 Locus geringer wird als auch die Bindung der RNA Polymerase II und von WDR5 im Bereich des Promotors abnimmt (Abbildung 47 A-C).

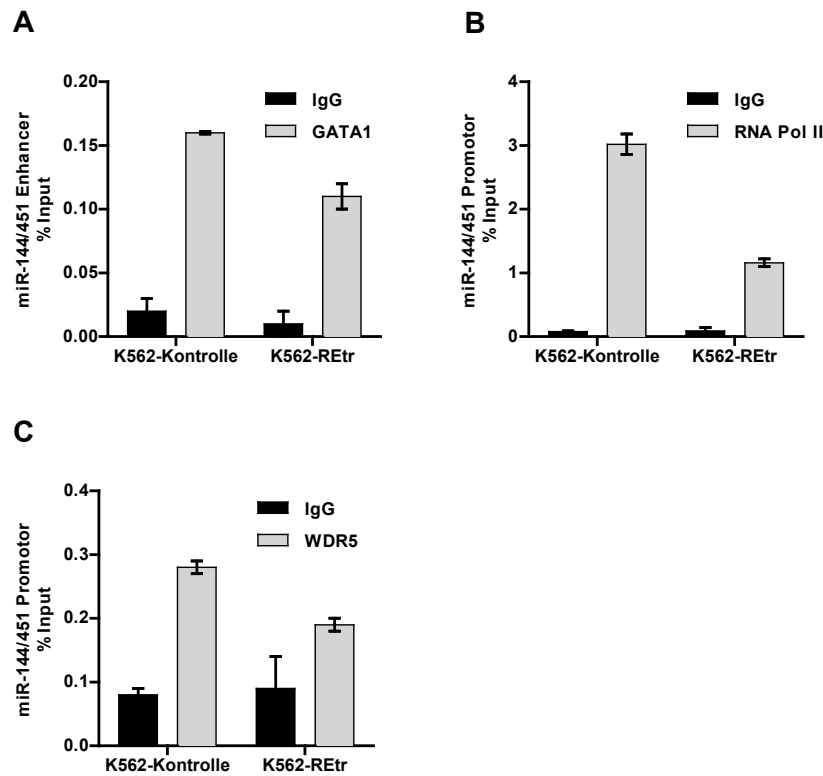


Abbildung 47: In Anwesenheit von *RUNX1-ETotr* (RE tr) verringert sich die Okkupation von GATA1, RNA Polymerase II und WDR5 im Lokusbereich der miR-144/451 in K562 im ChIP-Assay. ChIP-Lysate von K562 Zellen, die lentiviral mit *RUNX1-ETotr* bzw. dem Leervektor zur Kontrolle transduziert worden waren, wurden für die Chromatin-Immunopräzipitation verwendet. Die Anreicherung durch den jeweiligen Antikörper wurde mittels qRT-PCR nachgewiesen. **(A)** In Anwesenheit von *RUNX1-ETotr* sinkt die Anreicherung von GATA1 im Bereich des miR-144/451 Enhancers in K562 Zellen. **(B)** *RUNX1-ETotr* überexprimierende K562 Zellen weisen weniger Bindung der RNA Polymerase II an den miR-144/451 Promotor auf. **(C)** In Anwesenheit von *RUNX1-ETotr* sinkt die Anreicherung von WDR5 im Bereich des miR-144/451 Promotors in K562 Zellen. Aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei unabhängigen Werten wurde die Standardabweichung ermittelt und als Fehlerbalken dargestellt.

Die reduzierte Bindung von WDR5, das für die Trimethylierung am Lysin 4 des Histon 3 verantwortlich ist, in Anwesenheit von *RUNX1-ETotr* resultiert ebenfalls in einer verminderten H3K4 Trimethylierung im Promotorbereich (Abbildung 48 A) [211]. Ebenfalls konnte eine leichte Abnahme der H3K9 Acetylierung in den Zellen, die *RUNX1-ETotr* exprimieren, beobachtet werden (Abbildung 48 B).

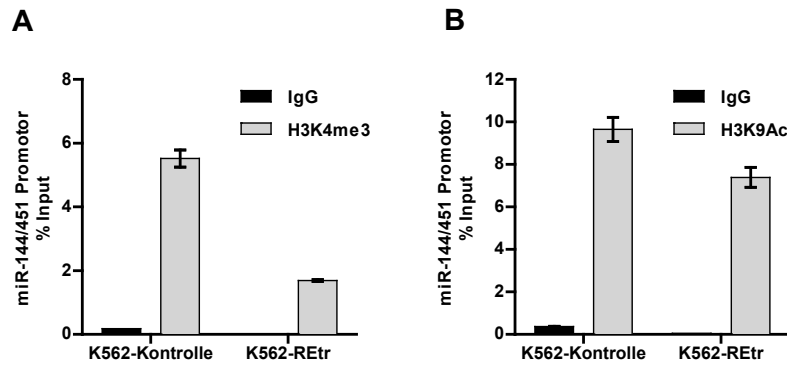


Abbildung 48: In Anwesenheit von RUNX1-ETOr (RE tr) reduzieren sich die Histonmodifikationen H3K4me3 sowie H3K9Ac im Promotorbereich des miR-144/451 Lokus in K562 im ChIP-Assay. ChIP-Lysate von K562 Zellen, die lentiviral mit *RUNX1-ETOr* bzw. dem Leervektor zur Kontrolle transduziert worden waren, wurden für die Chromatin-Immunopräzipitation verwendet. Die Anreicherung durch den jeweiligen Antikörper wurde mittels qRT-PCR nachgewiesen. **(A)** In Anwesenheit von RUNX1-ETOr sinkt die Trimethylierung am H3K4 im Bereich des miR-144/451 Promotors in K562 Zellen. **(B)** *RUNX1-ETOr* überexprimierende K562 Zellen weisen eine geringe Acetylierung am H3K9 im Bereich des miR-144/451 Promotors auf. Aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei unabhängigen Werten wurde die Standardabweichung ermittelt und als Fehlerbalken dargestellt.

---

## 6. Diskussion

1993 wurde in *C. elegans* die lin-4 RNA als erstes Mitglied einer hochspezialisierten Klasse von kleinen regulatorischen RNAs entdeckt. Damals noch als *short temporal* RNA (stRNA) betitelt, wurden 2001 alle daraufhin gefundenen stRNAs als mircoRNAs bezeichnet. Seitdem wurde eine Vielzahl neuer miRNAs in den unterschiedlichsten Spezies entdeckt [148]. Die intensive Erforschung der miRNAs in den letzten Jahren zeigte, dass diese bei der Regulation der Expression der meisten Gene von essentieller Bedeutung sind [212]. Eine Vielzahl von miRNAs sind besonders während der Hämatopoese involviert, da dieser ein komplexer Prozess ist, der von einem ganzen Netzwerk aus Transkriptionsfaktoren sowie weiteren Regulatorproteinen gesteuert wird.

Während der erythroiden Differenzierung ist das microRNA Cluster miR-144/451 von großer Bedeutung. Die Expression der miR-451 ist vornehmlich auf die erythroide Differenzierungslinie beschränkt und wird durch den erythroiden Transkriptionsfaktor GATA1 spezifisch aktiviert. Der Verlust der miR-451 führt zu einer gestörten terminalen Erythropoese und damit zur Anreicherung unreifer erythroider Vorläuferzellen [7, 200]. Darüber hinaus scheint die miR-451 eine Rolle bei der Entstehung von malignen Erkrankungen zu spielen. So konnte in verschiedenen Studien nachgewiesen werden, dass die Expression der miR-451 in Tumorerkrankungen dereguliert ist [188-192].

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst der Einfluss der miR-451 auf die erythroide Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen sowie humaner Zelllinien untersucht. Im Anschluss konnte aufgezeigt werden, dass das Fusionsprotein RUNX1-ETO, welches während der akuten myeloischen Leukämie exprimiert wird, sowohl die Expression des miRNA-Cluster miR-144/451 dereguliert als auch dessen Epigenetik im Promotorbereich.

### 6.1. miR-451 während der Hämatopoese

#### 6.1.1. miR-451 induziert die erythroide Differenzierung in hCD34+ Zellen

Der Transkriptionsfaktor RUNX1 ist essentiell für die megakaryozytäre Differenzierung und in vorherigen Arbeiten konnte u.a. gezeigt werden, dass hierbei RUNX1 die Expression erythroider Gene, wie u.a. *KLF1*, reprimiert [74, 207]. Auf diese Weise soll die Anwesenheit erythroider Regulatoren, wie z.B. Transkriptionsfaktoren, miRNAs sowie Cofaktoren, die das erythroide Genprogramm initiieren, verhindert werden. In der vorliegenden Arbeit konnte weiterführend aufgezeigt werden, dass RUNX1 auch die Expression von miRNAs, die bei der Hämatopoese von Bedeutung sind, stark beeinflusst. Hierfür wurde die humane Zelllinie K562, die sowohl erythroide als auch megakaryozytäre Merkmale aufweist, mit einem *RUNX1*

---

exprimierenden Vektor transduziert. Mittels miRNA-Sequenzierung wurden u.a. 30 differentiell exprimierte miRNAs gefunden, die laut Literatur während der Hämatopoese von Bedeutung sind. Davon spielen 11 miRNAs eine Rolle bei der erythroiden-megakaryozytären Differenzierung [7, 166-169, 186, 202-206]. Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass RUNX1 die Expression erythroider miRNAs wie miR-451, miR-144 und miR-126 reprimiert um die megakaryozytäre Differenzierung zu ermöglichen. In diesem Zusammenhang steigt auch die Expression megakaryozytärer miRNAs, wie z.B. der miR-146a, miR-150 und miR-27a (Abbildung 11). Somit konnten vorherige Daten bestätigt und neue erythroide miRNAs miR-144 und miR-451 als Ziele von RUNX1 ausfindig gemacht werden.

In vorherigen Studien konnte auch aufgezeigt werden, dass die Expression der microRNAs miR-144 und miR-451 u.a. während der erythroiden Differenzierung im Zebrafisch gesteigert ist [7, 201]. Dieses konnte nun ebenfalls im humanen System mittels induzierter erythroider Differenzierung in den Zelllinien K562 und TF-1 sowie in den hämatopoetischen Stammzellen hCD34+ nachgewiesen werden. Die erhöhte Expression der erythroiden Markergene *GYPA* und *CD71* korrelierte mit einer ebenfalls gesteigerten Expression des miR-144/451 Clusters (Abbildung 13 und Abbildung 15) [36, 37]. Um die Exklusivität der miR-144/451 Expression in der erythroiden Linie zu untersuchen, wurde diese während der megakaryozytären Differenzierung untersucht. Die Induktion der megakaryozytären Differenzierung führte zu einer gesteigerten Expression des Markergens *CD41* sowie zu einer reduzierten miR-144/451 Expression (Abbildung 16). Daher scheint die Expression des miR-144/451 Clusters auf die erythroide Differenzierungslinie beschränkt zu sein.

In Experimenten mit transduzierten humanen CD34+ Zellen, die das miR-144/451 Cluster exprimierten, konnte des Weiteren nachgewiesen werden, dass die miR-451 die erythroide Differenzierung in den Stammzellen induziert. hCD34+ Zellen, die das Cluster mit der funktionalen miR-451 DNA-Sequenz beinhielten, zeigten eine deutlich erhöhte Anzahl an erythroiden Kolonien im Vergleich zur Kontrolle. Dies ist vergleichbar mit der gesteigerten Anzahl erythroider Kolonien durch die Transduktion des Vektors mit dem erythroiden Transkriptionsfaktor *Tal1* (Abbildung 19). Demnach scheint die Anwesenheit und Funktionalität der miR-451 aktiv für die erythroide Differenzierung verantwortlich zu sein. Bruchova-Votavova und Mitarbeiter konnten einen ähnlichen Einfluss der miR-451 in K562-Zellen zeigen. Sie induzierten die erythroide Differenzierung mittels Hemin und transfezierten die K562 Zellen mit pre-miR-451. Die Zellen zeigten ebenfalls eine gesteigerte *GYPA* Expression sowie eine Zunahme der Hämoglobinkonzentration [213]. Demnach könnte die miR-451 zur Verbesserung der *in vitro* Herstellung von Erythrozyten verwendet werden. In Kombination mit



---

bereits etablierten Protokollen, die den Einsatz u.a. von Zytokinen vorsehen, könnte auf diese Weise die Erythrozytenherstellung stark erhöht werden.

In umgekehrter Weise konnte dieser Einfluss zuvor für die miR-223 gezeigt werden. Eine erhöhte Expression der miR-223 reprimiert die erythroide Differenzierung, da der erythroide Co-Regulator LMO2 ein direktes Ziel der miR-223 ist. Da LMO2 zu dem transkriptionellem Komplex von Tal1, E2A und GATA1 gehört, stört dessen verminderte Expression die Funktionalität des Komplexes. Somit kann die erythroide Differenzierung nicht mehr stattfinden [206, 214]. Diese Ergebnisse und Beispiele zeigen, dass microRNAs einen direkten regulatorischen Effekt auf die hämatopoetische Differenzierung haben.

### **6.1.2. Regulation des miR-144/451 Clusters durch hämatopoetische Transkriptionsfaktoren**

Die wichtigsten hämatopoetischen Transkriptionsfaktoren während der erythroiden bzw. megakaryozytären Differenzierung sind RUNX1, Tal1 sowie GATA1. Diese Transkriptionsfaktoren beeinflussen die Expression einer Vielzahl von Genen aber auch von microRNAs. RUNX1 ist während der megakaryozytären Differenzierung von großer Bedeutung und beeinflusst diese positiv [74]. Daher reprimiert RUNX1 Gene, die die Megakaryopoese hemmen würden und aktiviert Gene, die für die Megakaryozytendifferenzierung wichtig sind. So bindet RUNX1 unter anderem an den Locus des erythroiden Regulators KLF1 und blockiert dessen Expression, sodass die Differenzierung in Richtung der Megakaryopoese erfolgt [207]. Im Gegensatz dazu beeinflussen GATA1 und Tal1 die Expression erythroider Gene positiv [3, 56]. So konnte für den erythroiden Transkriptionsfaktor GATA1 gezeigt werden, dass dieser an den Locus des miR-144/451 Clusters bindet und dessen Expression hochreguliert [7].

Der Einfluss der Transkriptionsfaktoren Tal1, GATA1 sowie RUNX1 auf das miR-144/451 Cluster wurde in dieser Arbeit genauer untersucht. Zunächst konnte in Überexpressionsstudien mit den Transkriptionsfaktoren aufgezeigt werden, dass die erhöhte Expression von *RUNX1* in K562 Zellen die miR-144/451 Expression reprimiert, während die Überexpression von *GATA1* und *Tal1* zu einer gesteigerten miR-144/451 Expression führt (Abbildung 20 und Abbildung 21). Diese Ergebnisse bestätigen die Annahme, dass die microRNAs miR-144 und besonders die miR-451 während der Erythropoese von Bedeutung sind. Daher wird ihre Expression während der megakaryozytären Differenzierung unter anderem durch RUNX1 reprimiert. Im umgekehrten Fall führt ein *Knockdown* von *RUNX1* zur gesteigerten Expression des miR-144/451 Clusters, während die Herunterregulation von *Tal1* und *GATA1* die Reprimierung der Clusterexpression bedingt (Abbildung 22 und Abbildung 23).

---

Für die einzelne miR-451 konnte dies ebenfalls gezeigt werden (Abbildung 24). Somit beeinflussen die essentiellen hämatopoetischen Transkriptionsfaktoren RUNX1, Tal1 und GATA1 direkt die Expression des miR-144/451 Clusters.

### **6.1.3. Regulation der Promotor- bzw. Enhanceraktivität des miR-144/451 Clusters durch hämatopoetische Transkriptionsfaktoren**

Dore und Mitarbeiter konnten für den Mausloкус des miR-144/451 Clusters in ChIP-Experimenten zeigen, dass der erythroide Transkriptionsfaktor GATA1 in einem Bereich weit außerhalb des Promotors (-2,8 kb) verstärkt bindet [7]. Die Expression des miR-144/451 Clusters wird daher nicht nur von einem eigenen Promotor gesteuert, sondern ebenfalls von einem *Enhancer*-Bereich reguliert. Durch eine *in silico* Analyse des humanen miR-144/451 Lokus wurden verschiedene potentielle Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren Tal1, RUNX1 sowie GATA1 entdeckt (Abbildung 26). Diese sind sowohl im Promotor- als auch *Enhancer*-Bereich lokalisiert. Zudem befindet sich eine hoch konservierte Region im Bereich des Promotors. Es konnte gezeigt werden, dass RUNX1 die Aktivität des Promotor- und *Enhancer*-Bereich hemmt (Abbildung 27). Dies ist im Einklang mit den gewonnenen Expressionsdaten, da RUNX1 ebenfalls einen reprimierenden Einfluss auf diese ausübt. GATA1 und Tal1 zusammen mit dessen Co-Transkriptionsfaktor E47 erhöhen die Promotor- und *Enhancer*-Aktivität, während dessen *Knockdown* die Aktivität des Promotors sowie *Enhancers* vermindert. Diese Ergebnisse stimmen ebenfalls mit den Expressionsanalysen überein.

Mittels Chromatin-Immunopräzipitation von humanen CD34+ Zellen wurde anschließend die direkte Bindung von RUNX1, Tal1 und GATA1 im Promotor- bzw. *Enhancer*-Bereich nachgewiesen. Während RUNX1 bevorzugt im Promotorbereich des miR-144/451 Lokus bindet, zeigen GATA1 und Tal1 eine deutliche Bindung im Bereich des *Enhancers* (Abbildung 29). Die Bindung der Transkriptionsfaktoren variiert zudem während der Differenzierung. Die Anreicherung von GATA1 und Tal1 im Bereich des *Enhancers* nimmt während der erythroiden zu und ab bei der megakaryozytären Differenzierung. Die Okkupation des Promotorbereichs durch RUNX1 steigt hingegen während der megakaryozytären Differenzierung und ist reduziert während der erythroiden Differenzierung (Abbildung 31). Demnach reprimiert die direkte Bindung von RUNX1 im Promotorbereich die Expression des miR-144/451 Clusters. Binden jedoch die erythroiden Transkriptionsfaktoren GATA1 und Tal1 im *Enhancer*-Bereich des Lokus, so steigt dessen Aktivität sowie die Expression des miR-144/451 Clusters.

Somit konnten die Daten von Dore und Mitarbeiter für den humanen miR-144/451 Lokus bestätigt werden, da GATA1 die Aktivität des *Enhancer*-Bereichs sowie des Promotors steigert

---

[7]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass neben GATA1 auch Tal1 einen aktivierenden Einfluss auf beide Bereiche ausübt. Beide Transkriptionsfaktoren binden verstärkt nach induzierter erythroider Differenzierung im *Enhancer*-Bereich, wenn die Expression des miR-144/451 Clusters am höchsten ist. Weiterführend konnte aufgezeigt werden, dass die Histonmodifikationen H3K4me3 sowie H3K9Ac, die in Verbindung mit einem transkriptionell aktiven Chromatinbereich stehen, ebenfalls nach erythroider Differenzierung stark erhöht vorliegen (Abbildung 32) [90, 215]. Dies führt zum Schluss, dass der miR-144/451 Lokus durch Chromatin öffnende Histonmodifikationen wie H3K4me3 und H3K9Ac während der erythroiden Differenzierung zugänglich ist. Somit können die erythroiden Transkriptionsfaktoren GATA1 und Tal1 verstärkt im Bereich des *Enhancers* binden und die Expression des miR-144/451 Clusters induzieren.

Die Trimethylierung am Histon H3K4 erfolgt durch den MLL/WDR5-Komplex, während p300/PCAF u.a. die Acetylierung am Histon H3K9 vermitteln. Beide Komplexe werden von Tal1 und GATA1 an den Lokus rekrutiert, sodass die Öffnung des Chromatins erfolgt [211, 216]. Für p300 konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass es direkt mit Tal1 und GATA1 interagiert. Darüber hinaus wird GATA1 durch p300 ebenfalls acetyliert und dies führt zu einer transkriptionellen Aktivierung sowie gesteigerten Genexpression [217, 218]. Weitere Regulatorproteine sowie Cofaktoren können zum Lokus rekrutiert werden und die Expression des Clusters bzw. der microRNAs miR-144 und miR-451 aktivieren (Abbildung 49 A).

Während der Megakaryopoese ist die Expression der miR-144 und miR-451 nicht erwünscht. Somit bindet der Transkriptionsfaktor RUNX1, der im Gegensatz zu GATA1 und Tal1 während der megakaryozytären Differenzierung stark exprimiert wird, im Promotorbereich des miR-144/451 Lokus. RUNX1 kann ebenfalls eine Vielzahl von Cofaktoren, wie u.a. HDAC1 oder Sin3a, rekrutieren. In diesem Fall jedoch führt dies zu einer Verdichtung der Chromatinstruktur, sodass die Expression der microRNAs miR-144 und miR-451 verhindert wird. In weiterführenden Experimenten konnte für den Promotorbereich des miR-144/451 Lokus gezeigt werden, dass nach der megakaryozytären Differenzierung das Corepressorprotein Protein Arginin Methyltransferase 6 (PRMT6) den Promotor verstärkt okkupiert. PRMT6 ist für die asymmetrische Dimethylierung am Histon H3R2 (H3R2me2as) verantwortlich und diese Histonmodifikation wurde ebenfalls vermehrt im Bereich des Promotors vorgefunden [208, 219]. H3R3me2 befindet sich in transkriptionell inaktivem Chromatin und ist u.a. mit für die Inhibierung der aktivierenden H3K4 Trimethylierung (H3K4me3) zuständig [220]. Daher nimmt die Histonmodifikation H3K4me3 stark ab und der dafür verantwortliche Proteinkomplex MLL/WDR5 verlässt mit p300/PCAF den miR-144/451 Lokus [208]. Auf diese Weise werden die aktivierenden Histonmodifikationen H3K4me3 und H3K9Ac durch die repressive

Modifikation H3R2me2 ersetzt. Dies führt zur Komprimierung des Chromatins und die Expression der miR-144 sowie miR-451 ist stark gehemmt (Abbildung 49 B).

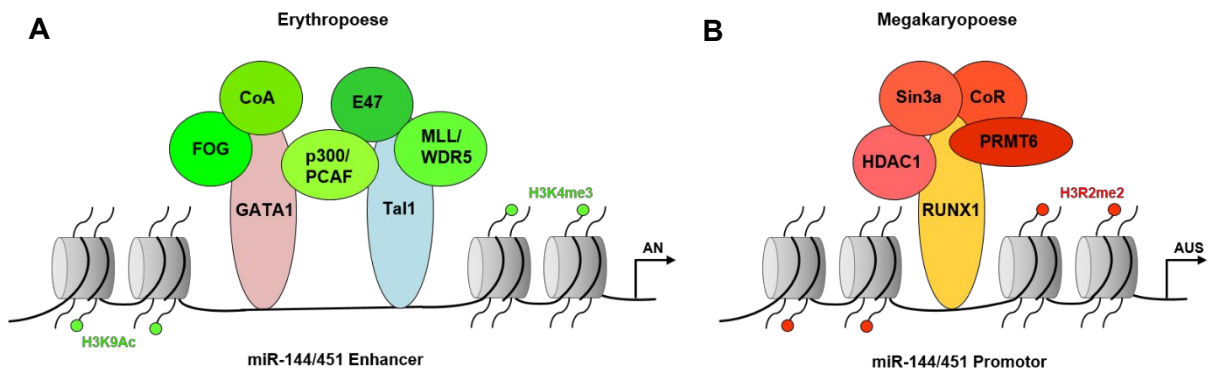


Abbildung 49: Modell der Okkupation des miR-144/451 *Enhancer*- bzw. Promotorbereichs durch die Transkriptionsfaktoren Tal1, GATA1 und RUNX1 während der Erythropoese sowie Megakaryopoese  
**(A)** Während der erythroiden Differenzierung binden die Transkriptionsfaktoren GATA1 und Tal1 im Bereich des *Enhancers* des miR-144/451 Lokus. Durch die Rekrutierung weiterer Coaktivatoren, wie u.a. dem MLL/WDR5-Komplex und p300/PCAF öffnen die aktivierenden Histonmodifikationen H3K4me3 sowie H3K9Ac den Chromatinbereich des Lokus, sodass die Genexpression erfolgen kann. **(B)** Während der Megakaryopoese okkupiert RUNX1 den Promotorbereich des miR-144/451 Lokus und rekrutiert Corepressorproteine, wie u.a. HDAC1, Sin3a und PRMT6. PRMT6 katalysiert die Histonmodifikation H3R2me2, die zur Komprimierung des Chromatins beiträgt, sodass die Expression der miR-144 bzw. miR-451 stark vermindert ist.

## 6.2. miR-451 in RUNX1-ETO exprimierenden Zellen

### 6.2.1. RUNX1-ETO reprimiert die miR-451 Expression

Bei AML-Patienten, die dem FAB M2-Typs zugeordnet werden können und das Fusionsprotein RUNX1-ETO exprimieren, wurde festgestellt, dass unter anderem die erythroide Differenzierung gestört ist. In Experimenten mit humanen CD34+ Zellen konnte gezeigt werden, dass RUNX1-ETO die Ausbildung erythroider Kolonien inhibiert, während gleichzeitig die Proliferationsrate dieser Zellen stark erhöht ist [209]. Diese Ergebnisse konnten in dieser Arbeit bestätigt und erweitert werden. Hierfür wurde parallel mit dem Volllängeprotein RUNX1-ETO sowie der trunkierten Isoform RUNX1-ETOftr gearbeitet, da diese direkt Leukämie induzieren kann [131].

*RUNX1-ETO* und *RUNX1-ETOftr* überexprimierende K562 Zellen zeigten eine verminderte Expression der erythroiden Gene  $\alpha$ -Globin sowie *KLF1*. Mittels FACS-Messungen wurde weiterhin festgestellt, dass die Präsenz des erythroiden Markerproteins CD71 auf der Zelloberfläche von K562 Zellen in Anwesenheit der RUNX1-ETO Proteine reduziert ist. Selbst nach der Induktion der erythroiden Differenzierung durch die Zugabe von Hemin wurde diese durch die Überexpression von *RUNX1-ETO* und *RUNX1-ETOftr* erheblich reprimiert (Abbildung 34). Um auszuschließen, dass der Effekt sich auf ein Zellsystem beschränkt, wurden die Expressionen von *CD71* und *GYP A* auch in TF1 Zellen bei Anwesenheit von RUNX1-ETO und

---

RUNX1-ETOr hin untersucht. Die Expression beider Gene war stark reprimiert sowie die Anzahl GYPA- und CD71-positiver Zellen im Vergleich zur Kontrolle erheblich reduziert (Abbildung 35). Somit führt die Anwesenheit der RUNX1-ETO Proteine zu einer reduzierten Expression verschiedener erythroider Gene in humanen Zelllinien. Dieser reprimierende Effekt konnte darüber hinaus auch in *RUNX1-ETO (tr)* transduzierten hCD34+ Zellen nachgewiesen werden. Außerdem bildeten im CFU-Assay *RUNX1-ETO(tr)* überexprimierende hCD34+ Zellen deutlich weniger erythroide Kolonien aus (Abbildung 36). Somit konnte bestätigt werden, dass RUNX1-ETO sowie die trunkierte Isoform in den Zelllinien K562 und TF1 sowie in humanen CD34+ Zellen die Expression erythroider Gene reprimiert und damit die erythroide Differenzierung hemmt. Um sicherzustellen, dass die Reprimierung der Genexpression von *KLF1* und *GYPA* direkt durch die Fusionsproteine erfolgt, wurde dessen Bindung an die Promotorbereiche untersucht. In ChIP-Assays konnte eine direkte Okkupation der *KLF1* und *GYPA* Promotorbereiche nachgewiesen werden (Abbildung 37). Somit konnte gezeigt werden, dass RUNX1-ETO die Expression erythroider Gene auch direkt durch die Bindung an deren Promotorbereiche beeinflusst.

Für die verwendeten Zellsysteme konnte nun gezeigt werden, dass RUNX1-ETO sowie RUNX1-ETOr an die Promotorbereiche erythroider Gene bindet und deren Expression reprimiert. Nachfolgend wurde daher untersucht, ob die Fusionsproteine auch einen Einfluss auf die Expression sowie Promotorokkupation des Clusters miR-144/451 ausüben. Die Überexpression von *RUNX1-ETO* und *RUNX1-ETOr* führte in den Zelllinien K562 und TF-1 sowie in den humanen CD34+ Zellen zu einer deutlichen Reprimierung der miR-144/451 Expression (Abbildung 38). Nach einem anschließenden *Knockdown* steigt die Expression der miR-144/451 sowie von *CD71* wieder an. Daher kann eindeutig die Repression der Expression auf die Anwesenheit der leukämischen Fusionsproteine zurück geführt werden (Abbildung 39 und Abbildung 43). Dieser reprimierende Effekt konnte im Weiteren auch für die Promotor- und *Enhancer*-Aktivität des miR-144/451 Clusters gezeigt werden (Abbildung 44). Somit reprimieren RUNX1-ETO und RUNX1-ETOr neben den bereits bekannten erythroiden Genen auch die Expression des miR-144/451 Clusters. Dies unterstützt die bisherigen Beobachtungen, die sowohl im Patienten als auch im Tiermodell gefunden wurden. In beiden Fällen kommt es in Anwesenheit des leukämischen Fusionsproteins zur Expansion unreifer hämatopoetischer Vorläuferzellen, die über die gesteigerte Fähigkeit zur Selbsterneuerung verfügen. Demnach ist die Differenzierung der hämatopoetischen Stammzellen in reife Blutzellen nicht mehr möglich [96, 129, 134].

In dieser Arbeit sowie in vorherigen Studien konnte aufgezeigt werden, dass das miR-144/451 Cluster während der terminalen erythroiden Differenzierung von großer Bedeutung ist [6]. Die

---

miR-451 scheint darüber hinaus auch alleine die erythroide Differenzierung induzieren zu können. Daher wird das Cluster der miR-144/451 ebenfalls zu einem wichtigen Faktor, der durch RUNX1-ETO zur Ausprägung der akuten myeloischen Leukämie reprimiert werden muss.

### **6.2.2. RUNX1-ETO okkupiert die Promotorregion des miR-144/451 Lokus**

Die DNA-Bindung von RUNX1-ETO bzw. RUNX1-ETOTr erfolgt über die identische RUNT-Domäne und Bindemotiv von RUNX1 [137]. Da in vorherigen Experimenten gezeigt werden konnte, dass RUNX1 bevorzugt an den Promotorbereich des miR-144/451 Lokus bindet, wurde die Okkupation der Promotorregion nach Überexpression von *RUNX1-ETO* untersucht. Die Bindung von RUNX1-ETO bzw. RUNX1-ETOTr konnte in K562 sowie hCD34+ Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 45). Darüber hinaus konnte für Kasumi-1 Zellen, die endogen *RUNX1-ETO* exprimieren, die Bindung an die Promotorregion des miR-144/451 Lokus gezeigt werden (Abbildung 46). Somit besteht die Okkupation des miR-144/451 Promotors durch RUNX1-ETO nicht nur in artifiziellen Überexpressionsexperimenten sondern auch auf endogenem Level. Da RUNX1-ETO sowie RUNX1-ETOTr über die NHR-Domänen im ETO-Anteil des Fusionsproteins mit einer Vielzahl von Cofaktoren interagieren kann, wurde abschließend untersucht, welchen Einfluss die Anwesenheit des Fusionsproteins auf die Histonmodifikationen sowie Rekrutierung aktivierender Cofaktoren am Promotorbereich hat. Es konnte gezeigt werden, dass die Bindung von GATA1 und der RNA Polymerase im Bereich des *Enhancers* bzw. Promotors geringer ist als im Vergleich zu den Kontrollzellen. Da GATA1 essentiell für die Expression des miR-144/451 Clusters ist, erklärt dies zusammen mit der reduzierten RNA Polymerase Bindung die verminderte Expression des Clusters [7]. Die Anwesenheit von WDR5, welches im MLL Komplex für die Trimethylierung am Lysin 4 des Histon 3 (H3K4me3) verantwortlich ist, ist am Promotorbereich ebenfalls reduziert (Abbildung 47) [211]. Daraus folgend ist die Histonmodifikation H3K4me3 ebenfalls verringert. Da es sich hierbei genau wie bei der Acetylierung des H3K9 (H2K9Ac) um eine aktivierende Histonmodifikation handelt, stimmt dessen Abnahme in Anwesenheit von RUNX1-ETOTr mit der reprimierten Expression des miR-144/451 Clusters überein (Abbildung 48).

Somit inhibiert RUNX1-ETO genau wie RUNX1 die Expression erythroider Gene und speziell in diesem Fall die Expression des miR-144/451 Clusters. Während der megakaryozytären Differenzierung ist die Expression von *RUNX1* stark erhöht und die Expression muss sich ausschließlich auf die für die Megakaryopoese relevante Gene beschränken. Daher bindet RUNX1 an dessen Genbereiche und rekrutiert Coaktivatoren, sodass die Genexpression gesteigert wird. Die Expression erythroider Gene hingegen ist nicht erwünscht. Somit okkupiert



RUNX1 Promotorbereiche erythroider Gene und rekrutiert Corepressoren. Hierzu zählen wie schon genannt u.a. Histonmodifizierende Proteine wie PRMT6, die die repressive Modifikation H3R2me2 katalysiert. Auf diese Weise kondensiert das Chromatin und die Expression der betroffenen Gene ist reprimiert [207, 219].

Die Inhibierung der erythroiden Differenzierung durch RUNX1-ETO erfolgt am frühestmöglichen Zeitpunkt der Erythropoese. So konnte u.a. gezeigt werden, dass RUNX1-ETO direkt mit GATA1 über die RUNT-Domäne interagiert und dessen Aktivität erheblich reduziert. Die Acetylierung zweier Lysincluster, die die GATA Zinkfinger motive flankieren, durch p300/CBP ist essentiell für die Aktivität von GATA1. RUNX1-ETO blockiert diese Transaktivierung und inhibiert auf diese Weise die erythroide Entwicklung [210].

Weiterhin konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass RUNX1-ETO den identischen Promotorbereich des miR-144/451 Locus wie RUNX1 okkupiert. Auf diese Weise kann RUNX1-ETO Corepressoren mittels der NHR-Domänen zum Promotor rekrutieren, sodass Coaktivatoren, wie GATA1 und WDR5, sowie die RNA Polymerase II den Promotorbereich verlassen. Aktive Histonmodifikationen, wie H3K4me3 und H3K9Ac, werden durch repressive ersetzt. Daraufhin kondensiert das Chromatin und die Genexpression ist gehemmt. Somit blockiert RUNX1-ETO zweifach die Expression des miR-144/451 Clusters. Zunächst inhibiert es direkt die Aktivität von GATA1, welches für die Expression des miR-144/451 Clusters essentiell ist, und zudem bindet das leukämische Fusionsprotein selbst im Promotorbereich und verändert dessen Epigenetik (Abbildung 50).

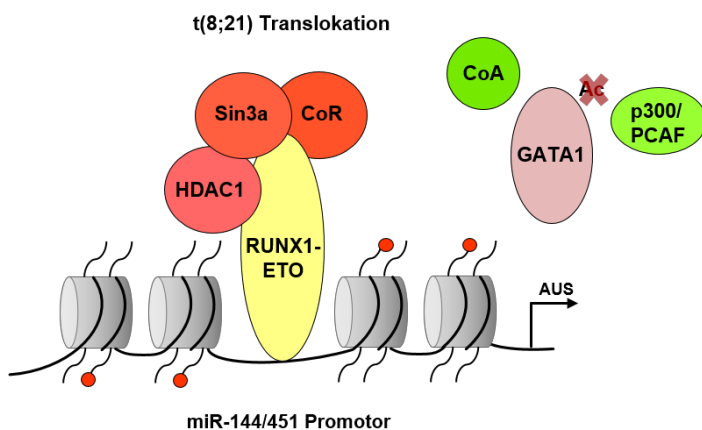


Abbildung 50: Modell der Reprimierung der miR-144/451 Expression durch RUNX1-ETO  
 RUNX1-ETO bindet an den Promotorbereich des miR-144/451 Locus und rekrutiert Corepressoren, wie u.a. Sin3a und HDAC1. Repressive Histonmodifikationen führen zur Kondensation des Chromatins, sodass der Locus nicht mehr zugänglich ist und die Expression der miRNAs miR-144 und miR-451 nicht mehr stattfinden kann. Gleichzeitig inhibiert RUNX1-ETO die Acetylierung von GATA1 durch p300, sodass die transkriptionelle Aktivität von GATA1 blockiert ist. Dies reprimiert die Expression des miR-144/451 Clusters ebenfalls.

---

Untersuchungen ergaben, dass leukämische Fusionsproteine, wie RUNX1-ETO, die Expression von *c-Myc* induzieren. Eine Hyperaktivität von *c-Myc* trägt erheblich zur Leukämogenese bei, da es für Zellwachstum sowie hämatopoetische Differenzierung essentiell ist [177]. Nun wurde von Su und Mitarbeitern entdeckt, dass *c-Myc* auch im Promotorbereich des miR-144/451 Clusters bindet und HDAC3 rekrutiert. Dies resultiert in der Deacetylierung der Histone, sodass die Expression der miRNAs miR-144 und miR-451 reprimiert wird [221].

Dies impliziert, dass die Expression des miR-144/451 Clusters konsequent durch verschiedene Ereignisse während der akuten myeloischen Leukämie reprimiert wird. Das könnte darauf zurück zu führen sein, dass die miR-451 sowohl für die Induktion der erythroiden Differenzierung von großer Bedeutung ist, als auch als Tumorsuppressor wirken kann [8, 9]. Demnach scheint es besonders wichtig zu sein, dass die Anwesenheit der miR-451 unterdrückt wird, sodass die Leukämogenese fortschreiten kann.

Diese Wirkweise von RUNX1-ETO konnte ebenfalls für die miR-223 sowie für das Cluster miR-222/221 gezeigt werden. Die Expression der miRNAs ist von großer Bedeutung für die Differenzierung myeloider Vorläuferzellen. In verschiedenen Experimenten konnte aufgezeigt werden, dass die Expression dieser miRNAs in Anwesenheit von RUNX1-ETO reprimiert ist. Die Promotorbereiche der miR-223 sowie miR-222/221 weisen ebenfalls RUNX1-Bindestellen auf, an die RUNX1-ETO bindet und Corepressoren, wie u.a. HDACs und DNMTs, rekrutiert. Auf diese Weise ändert sich die Struktur des Chromatins und die Expression der miR-223 und des miR-222/221 Clusters wird reprimiert. Dies führt wie bei den miRNAs miR-144 bzw. miR-451 zur Differenzierungsblockade und Anreicherung unreifer Vorläuferzellen [144, 222].

Mit Hilfe dieser Arbeit konnte ein weiterer Aspekt aufgedeckt werden, auf welche Weise RUNX1-ETO die normale Entwicklung hämatopoetischer Stammzellen reprimiert, sodass unreife Vorläuferzellen im Blut und Knochenmark während der Leukämogenese akkumulieren.



## 7. Anhang

### 7.1. Ergebnisse der miRNA-Sequenzierung *RUNX1* überexprimierender K562 Zellen

Tabelle 35: Ergebniss der miRNA-Sequenzierung von *RUNX1* überexprimierenden K562 Zellen. Dargestellt ist die Expressionsveränderung der miRNAs zur Referenz (Leervektor).

Mature miRNA	log2 foldchange	p-value	Mature miRNA	log2 foldchange	p-value
hsa-miR-143-3p	6.80	0.00E+00	hsa-miR-4429	-0.01	9.96E-01
hsa-miR-181a-3p	6.42	3.45E-75	hsa-miR-1343-5p	-0.01	9.95E-01
hsa-miR-205-5p	6.09	3.10E-57	hsa-miR-3661	-0.01	9.82E-01
hsa-miR-363-3p	5.34	2.36E-31	hsa-miR-1278	-0.01	9.76E-01
hsa-miR-1	5.14	7.09E-11	hsa-miR-454-5p	-0.01	9.46E-01
hsa-miR-1269a	4.75	1.61E-33	hsa-miR-25-3p	-0.02	8.33E-01
hsa-miR-4532	4.70	5.08E-93	hsa-miR-3157-3p	-0.02	9.28E-01
hsa-miR-187-3p	4.69	4.09E-12	hsa-miR-548a1	-0.03	9.63E-01
hsa-miR-664b-3p	4.63	6.61E-18	hsa-miR-18a-5p	-0.03	8.42E-01
hsa-miR-221-3p	4.27	2.03E-64	hsa-miR-520d-3p	-0.03	9.74E-01
hsa-miR-146a-5p	4.25	2.49E-108	hsa-miR-1276	-0.03	9.69E-01
hsa-miR-214-5p	4.20	1.01E-05	hsa-miR-4689	-0.03	9.63E-01
hsa-miR-3617-5p	3.99	3.51E-06	hsa-miR-520d-5p	-0.03	9.69E-01
hsa-miR-214-3p	3.96	6.43E-06	hsa-miR-491-3p	-0.04	9.48E-01
hsa-miR-143-5p	3.90	6.65E-05	hsa-miR-335-5p	-0.04	8.37E-01
hsa-miR-582-3p	3.73	2.23E-05	hsa-miR-195-5p	-0.04	8.87E-01
hsa-miR-181b-3p	3.58	5.22E-05	hsa-miR-6824-3p	-0.04	9.46E-01
hsa-miR-222-5p	3.47	1.01E-08	hsa-miR-1180-3p	-0.04	8.39E-01
hsa-miR-29b-3p	3.34	5.61E-05	hsa-miR-5697	-0.05	9.22E-01
hsa-miR-29b-2-5p	3.22	1.94E-10	hsa-miR-7-1-3p	-0.06	6.80E-01
hsa-miR-1911-5p	3.14	2.02E-03	hsa-miR-520a-5p	-0.06	8.54E-01
hsa-miR-340-5p	3.14	5.22E-41	hsa-miR-1229-3p	-0.07	9.23E-01
hsa-miR-3617-3p	3.13	2.05E-03	hsa-miR-93-3p	-0.08	6.65E-01
hsa-miR-489-3p	3.09	3.45E-22	hsa-miR-3675-5p	-0.08	8.26E-01
hsa-miR-29c-3p	3.07	7.77E-31	hsa-let-7e-3p	-0.08	7.68E-01
hsa-miR-1277-3p	2.94	5.31E-04	hsa-miR-191-3p	-0.09	6.75E-01
hsa-miR-10a-5p	2.91	8.95E-44	hsa-miR-6513-3p	-0.09	8.94E-01
hsa-miR-766-3p	2.84	1.03E-32	hsa-miR-32-3p	-0.09	6.62E-01
hsa-miR-5695	2.78	5.47E-04	hsa-miR-423-5p	-0.09	4.59E-01
hsa-miR-190a-5p	2.74	1.29E-13	hsa-miR-525-5p	-0.09	8.95E-01
hsa-miR-196a-5p	2.73	2.62E-14	hsa-miR-708-5p	-0.10	9.14E-01
hsa-miR-28-5p	2.60	3.89E-04	hsa-miR-4638-3p	-0.10	8.58E-01
hsa-miR-222-3p	2.59	7.25E-31	hsa-miR-3155a	-0.10	8.74E-01
hsa-miR-34a-5p	2.57	2.28E-06	hsa-miR-526b-5p	-0.10	8.43E-01
hsa-miR-653-5p	2.55	3.52E-32	hsa-miR-581	-0.11	8.27E-01
hsa-miR-628-5p	2.53	7.21E-55	hsa-miR-6816-3p	-0.11	9.00E-01
hsa-miR-3065-3p	2.50	5.57E-11	hsa-let-7c-5p	-0.11	8.09E-01
hsa-miR-6844	2.49	1.17E-02	hsa-miR-4704-3p	-0.12	8.53E-01
hsa-miR-181c-5p	2.45	8.49E-61	hsa-miR-8072	-0.12	8.91E-01
hsa-miR-29a-3p	2.43	2.15E-42	hsa-miR-339-5p	-0.12	6.40E-01
hsa-miR-340-3p	2.40	1.65E-23	hsa-miR-1323	-0.13	7.65E-01
hsa-miR-3613-5p	2.40	5.29E-11	hsa-miR-33b-5p	-0.13	4.59E-01
hsa-miR-6730-5p	2.36	9.46E-03	hsa-miR-302a-5p	-0.13	8.96E-01
hsa-miR-3613-3p	2.35	5.08E-07	hsa-miR-320b	-0.14	8.64E-01
hsa-miR-656-3p	2.35	1.63E-02	hsa-miR-1263	-0.14	7.38E-01
hsa-miR-34b-5p	2.34	1.25E-02	hsa-miR-548ac	-0.15	8.60E-01
hsa-miR-6769b-3p	2.30	2.28E-04	hsa-miR-125a-5p	-0.15	3.86E-01

Mature miRNA	log2 foldchange	p-value	Mature miRNA	log2 foldchange	p-value
hsa-miR-664a-3p	2.28	4.62E-26	hsa-miR-597-3p	-0.16	7.42E-01
hsa-miR-5683	2.28	6.71E-07	hsa-miR-219b-3p	-0.16	7.20E-01
hsa-miR-653-3p	2.27	2.86E-04	hsa-miR-16-1-3p	-0.16	6.51E-01
hsa-miR-142-3p	2.24	2.53E-19	hsa-miR-195-3p	-0.16	7.48E-01
hsa-miR-4750-5p	2.22	2.57E-02	hsa-miR-20a-5p	-0.16	3.19E-01
hsa-miR-28-3p	2.21	1.19E-12	hsa-miR-3651	-0.17	4.23E-01
hsa-miR-150-5p	2.21	7.13E-03	hsa-miR-6847-5p	-0.18	8.56E-01
hsa-miR-582-5p	2.19	3.05E-02	hsa-miR-520e	-0.18	8.52E-01
hsa-miR-7703	2.19	1.83E-02	hsa-miR-5581-3p	-0.19	5.56E-01
hsa-miR-7706	2.17	3.02E-03	hsa-miR-548a-5p	-0.19	5.87E-01
hsa-miR-6819-3p	2.16	3.02E-02	hsa-miR-21-3p	-0.19	1.68E-01
hsa-miR-29a-5p	2.16	8.47E-10	hsa-miR-7854-3p	-0.20	6.61E-01
hsa-miR-181c-3p	2.14	1.26E-41	hsa-miR-219a-1-3p	-0.20	4.56E-01
hsa-miR-664a-5p	2.13	1.93E-12	hsa-miR-147b	-0.20	5.71E-01
hsa-miR-1538	2.10	2.55E-03	hsa-miR-339-3p	-0.21	1.69E-01
hsa-miR-1179	2.09	1.37E-02	hsa-miR-4655-5p	-0.21	8.30E-01
hsa-miR-642a-5p	2.09	1.04E-09	hsa-miR-548j-5p	-0.21	5.04E-01
hsa-miR-24-3p	2.09	2.38E-02	hsa-miR-378a-5p	-0.21	1.55E-01
hsa-miR-1248	2.06	2.96E-05	hsa-miR-4326	-0.22	1.62E-01
hsa-miR-642b-5p	2.06	1.18E-06	hsa-miR-5706	-0.22	5.57E-01
hsa-miR-328-3p	2.05	7.87E-15	hsa-miR-424-3p	-0.23	3.70E-01
hsa-miR-10b-5p	2.02	4.18E-18	hsa-miR-141-5p	-0.24	5.57E-01
hsa-miR-148a-3p	2.00	6.02E-34	hsa-miR-6892-5p	-0.24	7.78E-01
hsa-miR-10a-3p	1.99	9.36E-18	hsa-miR-4787-3p	-0.24	7.48E-01
hsa-miR-874-5p	1.99	3.43E-10	hsa-miR-487a-3p	-0.24	7.78E-01
hsa-miR-6746-3p	1.97	4.93E-02	hsa-miR-548t-5p	-0.24	7.98E-01
hsa-miR-6837-3p	1.95	5.37E-02	hsa-miR-4484	-0.25	7.70E-01
hsa-miR-34c-5p	1.94	1.76E-11	hsa-miR-6762-3p	-0.25	7.94E-01
hsa-miR-181b-5p	1.91	8.79E-13	hsa-miR-579-5p	-0.26	4.27E-01
hsa-miR-6726-3p	1.90	4.28E-02	hsa-miR-17-5p	-0.27	5.76E-02
hsa-miR-3065-5p	1.90	1.75E-05	hsa-miR-19b-1-5p	-0.27	1.33E-01
hsa-miR-301a-3p	1.88	3.70E-23	hsa-miR-92a-3p	-0.27	1.33E-01
hsa-miR-6505-3p	1.85	5.35E-02	hsa-miR-580-3p	-0.27	1.94E-01
hsa-miR-3154	1.85	1.20E-02	hsa-miR-643	-0.27	3.96E-01
hsa-miR-184	1.85	9.90E-06	hsa-miR-4753-5p	-0.27	7.29E-01
hsa-miR-326	1.84	9.99E-10	hsa-miR-3157-5p	-0.28	3.90E-01
hsa-miR-30c-5p	1.82	3.88E-04	hsa-miR-6857-3p	-0.28	6.59E-01
hsa-miR-421	1.81	1.05E-22	hsa-miR-655-3p	-0.29	7.20E-01
hsa-miR-219a-5p	1.80	1.23E-04	hsa-miR-377-3p	-0.29	7.67E-01
hsa-miR-3134	1.80	5.97E-02	hsa-miR-3165	-0.29	7.00E-01
hsa-miR-181d-5p	1.79	1.03E-24	hsa-miR-5582-3p	-0.29	6.58E-01
hsa-miR-142-5p	1.78	3.23E-22	hsa-miR-200b-3p	-0.30	2.50E-01
hsa-miR-210-5p	1.78	2.72E-19	hsa-miR-296-5p	-0.30	5.86E-01
hsa-miR-6836-3p	1.75	4.84E-02	hsa-miR-4638-5p	-0.30	7.53E-01
hsa-miR-3615	1.74	7.65E-19	hsa-miR-484	-0.31	3.75E-02
hsa-miR-24-1-5p	1.72	3.55E-03	hsa-miR-1296-5p	-0.31	5.05E-02
hsa-miR-361-3p	1.71	1.01E-13	hsa-miR-624-3p	-0.31	2.20E-01
hsa-miR-24-2-5p	1.71	1.20E-12	hsa-miR-6886-5p	-0.32	7.13E-01
hsa-miR-186-3p	1.70	3.32E-03	hsa-miR-3144-3p	-0.32	5.47E-01
hsa-miR-433-3p	1.68	5.62E-02	hsa-miR-4749-5p	-0.32	7.23E-01
hsa-miR-676-3p	1.68	7.21E-02	hsa-miR-4766-5p	-0.32	6.71E-01
hsa-miR-3064-5p	1.67	7.66E-02	hsa-let-7d-3p	-0.32	5.27E-01
hsa-miR-542-3p	1.66	9.01E-09	hsa-miR-548l	-0.32	2.95E-01
hsa-miR-374b-5p	1.66	2.57E-13	hsa-miR-518b	-0.33	4.77E-01
hsa-miR-26b-5p	1.66	2.64E-34	hsa-miR-125a-3p	-0.33	4.94E-02
hsa-miR-3660	1.66	9.78E-05	hsa-miR-519b-3p	-0.33	7.38E-01

Mature miRNA	log2 foldchange	p-value	Mature miRNA	log2 foldchange	p-value
hsa-miR-135b-5p	1.65	9.26E-17	hsa-miR-19b-3p	-0.33	2.77E-02
hsa-miR-6793-3p	1.64	3.11E-02	hsa-miR-449b-5p	-0.34	7.17E-01
hsa-miR-204-5p	1.62	2.73E-12	hsa-miR-99b-5p	-0.34	3.21E-01
hsa-miR-6516-5p	1.62	1.60E-03	hsa-miR-106b-3p	-0.34	4.72E-02
hsa-miR-943	1.61	5.03E-02	hsa-miR-328-5p	-0.34	7.27E-01
hsa-miR-4284	1.60	8.05E-02	hsa-miR-301a-5p	-0.35	3.79E-01
hsa-miR-3611	1.59	4.88E-04	hsa-miR-570-3p	-0.35	2.03E-01
hsa-miR-4778-3p	1.58	8.31E-02	hsa-miR-7977	-0.35	5.88E-01
hsa-miR-23a-3p	1.56	1.09E-13	hsa-miR-2278	-0.36	5.77E-01
hsa-miR-6756-3p	1.55	1.26E-01	hsa-miR-4762-5p	-0.36	4.97E-01
hsa-miR-200a-3p	1.54	1.42E-02	hsa-miR-3939	-0.36	3.38E-01
hsa-miR-410-3p	1.54	3.47E-06	hsa-miR-19a-5p	-0.36	1.88E-01
hsa-miR-20b-5p	1.53	4.94E-05	hsa-miR-132-3p	-0.37	4.74E-03
hsa-miR-342-3p	1.53	3.01E-11	hsa-miR-4726-5p	-0.38	6.94E-01
hsa-miR-874-3p	1.53	3.73E-08	hsa-miR-5189-5p	-0.38	5.19E-01
hsa-miR-542-5p	1.52	1.86E-03	hsa-miR-379-5p	-0.38	4.16E-01
hsa-miR-34b-3p	1.51	1.33E-01	hsa-miR-4797-3p	-0.39	5.12E-01
hsa-miR-29c-5p	1.51	8.82E-08	hsa-miR-4521	-0.39	7.36E-02
hsa-miR-375	1.49	2.19E-18	hsa-miR-4704-5p	-0.39	4.82E-01
hsa-miR-744-5p	1.48	4.15E-38	hsa-miR-933	-0.39	2.55E-01
hsa-miR-18b-5p	1.48	3.18E-03	hsa-miR-939-5p	-0.40	3.87E-01
hsa-miR-889-3p	1.48	9.13E-07	hsa-miR-4512	-0.40	4.97E-01
hsa-miR-652-3p	1.47	2.56E-15	hsa-miR-4652-3p	-0.40	5.99E-01
hsa-miR-4999-5p	1.46	1.16E-01	hsa-miR-3136-5p	-0.40	1.92E-01
hsa-miR-301b	1.46	2.49E-16	hsa-miR-3922-3p	-0.40	1.11E-01
hsa-miR-3127-5p	1.46	2.05E-03	hsa-miR-27a-5p	-0.40	1.06E-02
hsa-miR-140-5p	1.44	9.36E-10	hsa-miR-518f-3p	-0.42	5.49E-01
hsa-miR-3607-3p	1.43	7.91E-15	hsa-miR-1226-5p	-0.43	6.16E-01
hsa-miR-107	1.43	5.86E-09	hsa-miR-20a-3p	-0.44	4.34E-04
hsa-miR-6732-3p	1.42	4.94E-02	hsa-miR-30c-1-3p	-0.45	2.37E-03
hsa-miR-30b-5p	1.40	4.38E-19	hsa-miR-130b-5p	-0.45	2.03E-05
hsa-miR-6764-3p	1.39	1.77E-01	hsa-miR-4766-3p	-0.45	2.97E-01
hsa-miR-6882-5p	1.38	1.36E-01	hsa-miR-4664-3p	-0.46	3.28E-01
hsa-miR-369-5p	1.38	4.65E-02	hsa-miR-128-1-5p	-0.46	4.23E-02
hsa-miR-190a-3p	1.38	1.19E-01	hsa-miR-6797-3p	-0.46	6.01E-01
hsa-miR-103a-2-5p	1.36	7.74E-03	hsa-miR-4803	-0.47	5.08E-01
hsa-miR-26a-5p	1.36	1.18E-03	hsa-miR-4517	-0.47	1.36E-01
hsa-miR-1298-5p	1.35	1.25E-01	hsa-miR-3187-3p	-0.47	2.67E-01
hsa-miR-652-5p	1.34	2.48E-07	hsa-miR-17-3p	-0.47	6.68E-04
hsa-miR-518c-3p	1.33	1.17E-01	hsa-miR-5587-3p	-0.48	2.87E-01
hsa-miR-210-3p	1.32	1.52E-14	hsa-miR-144-5p	-0.48	2.33E-02
hsa-miR-574-3p	1.31	3.33E-09	hsa-miR-616-3p	-0.49	3.18E-01
hsa-miR-1237-3p	1.30	2.41E-02	hsa-miR-5092	-0.49	5.99E-01
hsa-miR-338-3p	1.29	1.45E-01	hsa-miR-7114-3p	-0.50	4.03E-01
hsa-miR-3202	1.27	1.94E-01	hsa-miR-1343-3p	-0.50	1.83E-01
hsa-miR-361-5p	1.27	1.13E-07	hsa-miR-548n	-0.50	9.50E-02
hsa-miR-3188	1.27	6.07E-03	hsa-miR-1301-3p	-0.51	1.14E-01
hsa-miR-141-3p	1.26	3.55E-11	hsa-miR-937-5p	-0.51	5.98E-01
hsa-miR-30e-3p	1.26	2.87E-14	hsa-miR-27b-5p	-0.52	1.26E-01
hsa-miR-4646-3p	1.26	1.18E-01	hsa-miR-505-3p	-0.53	9.43E-04
hsa-miR-374a-5p	1.26	7.75E-10	hsa-miR-1294	-0.53	7.09E-02
hsa-miR-30e-5p	1.25	5.70E-09	hsa-miR-6815-5p	-0.54	5.01E-01
hsa-miR-148b-3p	1.25	2.48E-11	hsa-miR-1909-3p	-0.54	5.96E-01
hsa-miR-6751-3p	1.25	1.82E-01	hsa-miR-3692-3p	-0.55	5.40E-01
hsa-miR-3685	1.22	1.69E-01	hsa-miR-6886-3p	-0.55	5.73E-01
hsa-miR-369-3p	1.22	7.56E-02	hsa-miR-15a-3p	-0.55	3.01E-01

Mature miRNA	log2 foldchange	p-value	Mature miRNA	log2 foldchange	p-value
hsa-miR-1468-5p	1.22	7.41E-10	hsa-miR-1285-3p	-0.55	2.58E-01
hsa-miR-4687-5p	1.21	2.81E-03	hsa-miR-877-5p	-0.56	1.81E-03
hsa-miR-23b-3p	1.21	3.33E-11	hsa-miR-3175	-0.56	5.09E-01
hsa-miR-580-5p	1.20	1.10E-01	hsa-miR-370-3p	-0.56	2.61E-01
hsa-miR-3200-3p	1.20	5.39E-03	hsa-miR-7974	-0.57	4.29E-01
hsa-miR-499a-5p	1.20	1.54E-04	hsa-miR-331-5p	-0.57	1.29E-02
hsa-miR-429	1.19	1.10E-01	hsa-miR-3618	-0.57	5.66E-01
hsa-miR-4781-3p	1.18	4.20E-03	hsa-miR-378c	-0.57	3.90E-01
hsa-miR-15a-5p	1.18	5.52E-08	hsa-miR-588	-0.57	3.25E-01
hsa-miR-642a-3p	1.17	2.49E-05	hsa-miR-132-5p	-0.57	3.07E-02
hsa-miR-548e-5p	1.17	9.88E-06	hsa-miR-345-3p	-0.58	5.77E-01
hsa-miR-760	1.16	1.30E-02	hsa-miR-4755-3p	-0.58	4.33E-01
hsa-miR-6737-3p	1.15	7.72E-02	hsa-miR-299-3p	-0.58	1.56E-01
hsa-miR-1976	1.15	7.69E-03	hsa-miR-6783-3p	-0.59	4.69E-01
hsa-miR-409-3p	1.15	4.65E-05	hsa-miR-3683	-0.60	5.48E-01
hsa-miR-454-3p	1.15	3.62E-09	hsa-miR-379-3p	-0.60	3.75E-01
hsa-miR-4761-3p	1.14	1.01E-04	hsa-miR-3908	-0.60	5.11E-01
hsa-miR-6855-5p	1.14	2.62E-01	hsa-miR-576-5p	-0.61	2.10E-05
hsa-miR-592	1.13	2.51E-01	hsa-miR-548s	-0.61	1.43E-02
hsa-miR-4742-3p	1.13	3.93E-02	hsa-miR-485-5p	-0.61	4.11E-01
hsa-miR-3928-3p	1.13	3.80E-03	hsa-miR-1284	-0.61	2.43E-01
hsa-miR-146b-3p	1.13	5.68E-19	hsa-miR-4728-3p	-0.61	5.06E-01
hsa-miR-144-3p	1.13	6.71E-17	hsa-miR-939-3p	-0.62	4.32E-01
hsa-miR-1908-5p	1.12	2.20E-11	hsa-miR-330-3p	-0.62	5.01E-03
hsa-miR-3194-3p	1.12	1.67E-02	hsa-miR-4746-5p	-0.62	4.14E-02
hsa-miR-188-3p	1.12	2.00E-02	hsa-miR-4676-5p	-0.62	5.03E-01
hsa-miR-3064-3p	1.12	2.58E-01	hsa-miR-6805-5p	-0.63	5.05E-01
hsa-miR-1287-5p	1.12	6.95E-02	hsa-miR-193b-5p	-0.63	1.50E-01
hsa-miR-128-3p	1.11	4.03E-06	hsa-miR-5010-5p	-0.64	3.74E-01
hsa-miR-6818-5p	1.11	2.26E-01	hsa-miR-4676-3p	-0.64	3.16E-01
hsa-miR-3672	1.10	1.39E-01	hsa-miR-320c	-0.65	4.80E-01
hsa-miR-612	1.09	2.97E-01	hsa-miR-495-3p	-0.65	3.91E-01
hsa-miR-6833-3p	1.09	2.31E-01	hsa-miR-224-3p	-0.66	1.06E-03
hsa-miR-3196	1.09	3.43E-02	hsa-miR-223-5p	-0.66	4.62E-11
hsa-miR-191-5p	1.08	1.09E-06	hsa-miR-6763-3p	-0.67	4.58E-01
hsa-miR-130a-3p	1.08	1.10E-01	hsa-miR-6802-3p	-0.67	3.48E-01
hsa-miR-27b-3p	1.07	8.85E-15	hsa-miR-6513-5p	-0.68	4.60E-01
hsa-miR-6855-3p	1.07	7.33E-03	hsa-miR-145-3p	-0.70	4.26E-04
hsa-miR-3687	1.06	2.04E-04	hsa-miR-4786-5p	-0.70	9.79E-02
hsa-miR-200c-3p	1.06	1.48E-05	hsa-miR-6503-5p	-0.70	1.31E-01
hsa-miR-6879-3p	1.06	2.46E-01	hsa-miR-486-5p	-0.71	1.22E-02
hsa-miR-323b-3p	1.04	1.17E-01	hsa-miR-197-5p	-0.71	1.73E-01
hsa-miR-146b-5p	1.03	1.91E-14	hsa-miR-485-3p	-0.71	4.16E-01
hsa-miR-548as-3p	1.03	1.74E-01	hsa-miR-302a-3p	-0.71	4.50E-01
hsa-miR-32-5p	1.03	1.10E-05	hsa-miR-4516	-0.71	1.08E-01
hsa-miR-331-3p	1.02	2.30E-05	hsa-miR-16-2-3p	-0.72	2.66E-07
hsa-miR-223-3p	1.01	1.48E-04	hsa-miR-4443	-0.73	7.08E-02
hsa-miR-548aw	1.01	2.23E-01	hsa-miR-7851-3p	-0.73	3.35E-01
hsa-miR-374b-3p	1.01	1.52E-08	hsa-miR-215-5p	-0.73	1.00E-03
hsa-miR-5588-5p	1.00	2.90E-01	hsa-miR-3610	-0.73	4.36E-01
hsa-miR-27a-3p	1.00	1.15E-07	hsa-miR-548ax	-0.73	3.11E-03
hsa-miR-660-3p	1.00	5.63E-02	hsa-miR-1272	-0.74	1.68E-01
hsa-miR-3174	0.98	1.82E-01	hsa-miR-451a	-0.74	7.08E-06
hsa-miR-342-5p	0.98	1.48E-04	hsa-miR-543	-0.74	3.55E-01
hsa-miR-3681-3p	0.98	6.77E-02	hsa-miR-550a-3-5p	-0.75	9.06E-03
hsa-miR-155-5p	0.98	7.58E-02	hsa-miR-629-5p	-0.75	4.67E-09

Mature miRNA	log2 foldchange	p-value	Mature miRNA	log2 foldchange	p-value
hsa-miR-660-5p	0.98	3.64E-06	hsa-miR-573	-0.77	1.69E-01
hsa-miR-4479	0.97	2.92E-01	hsa-miR-4672	-0.77	2.88E-01
hsa-miR-4767	0.95	2.15E-01	hsa-miR-3918	-0.79	1.68E-01
hsa-miR-6755-5p	0.95	3.40E-01	hsa-miR-3177-3p	-0.80	6.40E-03
hsa-miR-432-5p	0.94	5.46E-02	hsa-miR-7155-3p	-0.80	2.32E-01
hsa-miR-30d-3p	0.94	8.83E-08	hsa-let-7f-2-3p	-0.80	1.56E-02
hsa-miR-5006-3p	0.93	2.71E-01	hsa-miR-4745-3p	-0.80	3.99E-01
hsa-miR-19a-3p	0.93	2.57E-10	hsa-miR-3163	-0.81	8.35E-02
hsa-miR-33a-5p	0.92	5.39E-05	hsa-miR-520a-3p	-0.82	4.85E-02
hsa-miR-136-5p	0.92	5.51E-02	hsa-miR-5001-5p	-0.82	3.42E-01
hsa-miR-3149	0.92	3.00E-01	hsa-miR-6775-3p	-0.82	1.53E-01
hsa-miR-148a-5p	0.92	4.67E-09	hsa-miR-493-3p	-0.82	1.09E-02
hsa-miR-374a-3p	0.92	2.80E-08	hsa-miR-942-5p	-0.83	6.79E-08
hsa-miR-197-3p	0.92	5.56E-05	hsa-miR-6733-5p	-0.83	2.37E-01
hsa-miR-455-3p	0.91	2.72E-01	hsa-miR-501-3p	-0.84	1.61E-02
hsa-miR-145-5p	0.91	1.79E-06	hsa-miR-96-5p	-0.85	9.45E-05
hsa-miR-6806-3p	0.91	2.84E-01	hsa-miR-6875-5p	-0.85	3.48E-01
hsa-miR-30d-5p	0.91	2.07E-12	hsa-miR-6805-3p	-0.86	3.08E-01
hsa-miR-449a	0.90	2.22E-02	hsa-miR-18a-3p	-0.86	1.32E-03
hsa-miR-487b-3p	0.89	6.35E-02	hsa-miR-3942-3p	-0.86	5.82E-02
hsa-miR-2277-3p	0.89	7.20E-02	hsa-miR-320e	-0.86	2.69E-01
hsa-miR-6852-5p	0.89	4.84E-02	hsa-miR-151a-5p	-0.86	1.94E-12
hsa-miR-6793-5p	0.88	3.39E-01	hsa-miR-1227-3p	-0.87	1.83E-01
hsa-miR-3912-3p	0.88	1.01E-03	hsa-miR-4458	-0.87	1.70E-01
hsa-miR-1255a	0.87	1.62E-02	hsa-miR-212-3p	-0.88	1.94E-04
hsa-miR-1249	0.87	3.37E-02	hsa-miR-6747-3p	-0.89	4.03E-02
hsa-miR-5008-3p	0.86	3.53E-01	hsa-miR-135a-3p	-0.89	1.42E-01
hsa-miR-337-3p	0.86	1.12E-01	hsa-miR-299-5p	-0.91	2.40E-01
hsa-miR-944	0.86	9.04E-04	hsa-miR-3691-3p	-0.91	2.82E-01
hsa-miR-330-5p	0.85	2.74E-06	hsa-miR-3688-3p	-0.93	3.44E-01
hsa-miR-4454	0.85	2.95E-01	hsa-miR-3176	-0.93	2.22E-03
hsa-miR-769-3p	0.84	5.83E-03	hsa-miR-219b-5p	-0.94	1.03E-02
hsa-miR-136-3p	0.83	6.00E-05	hsa-miR-4671-3p	-0.94	2.22E-01
hsa-miR-194-3p	0.82	2.46E-02	hsa-miR-452-3p	-0.95	5.55E-08
hsa-miR-498	0.82	3.67E-01	hsa-miR-624-5p	-0.95	1.37E-06
hsa-miR-1197	0.82	3.85E-01	hsa-miR-3942-5p	-0.96	3.39E-03
hsa-miR-891a-5p	0.82	1.22E-01	hsa-miR-126-5p	-0.96	5.31E-03
hsa-miR-221-5p	0.81	4.17E-02	hsa-miR-3189-3p	-0.96	1.93E-01
hsa-miR-6894-3p	0.81	2.97E-01	hsa-miR-6804-5p	-0.96	3.35E-01
hsa-miR-7705	0.80	9.17E-03	hsa-miR-556-5p	-0.97	1.51E-01
hsa-miR-185-3p	0.80	5.16E-04	hsa-miR-3667-5p	-0.98	3.90E-04
hsa-miR-103a-3p	0.80	1.44E-04	hsa-miR-149-5p	-1.00	1.41E-03
hsa-miR-5001-3p	0.79	3.17E-02	hsa-miR-1304-5p	-1.00	3.67E-05
hsa-miR-22-3p	0.79	2.34E-10	hsa-miR-4640-3p	-1.00	2.31E-01
hsa-miR-3605-3p	0.79	4.48E-02	hsa-miR-411-3p	-1.01	1.23E-01
hsa-miR-22-5p	0.79	2.27E-05	hsa-miR-3684	-1.01	8.87E-03
hsa-miR-499b-5p	0.78	4.37E-01	hsa-miR-3940-3p	-1.01	5.54E-04
hsa-miR-6735-5p	0.78	2.99E-01	hsa-miR-190b	-1.01	1.34E-03
hsa-miR-4749-3p	0.78	3.72E-01	hsa-miR-4804-3p	-1.02	2.53E-01
hsa-miR-185-5p	0.78	3.51E-09	hsa-miR-3662	-1.02	1.74E-01
hsa-miR-4677-3p	0.77	3.58E-06	hsa-miR-372-3p	-1.03	1.98E-01
hsa-miR-1306-5p	0.77	8.98E-07	hsa-miR-503-3p	-1.06	2.15E-01
hsa-miR-651-5p	0.76	1.22E-03	hsa-miR-490-3p	-1.06	2.76E-01
hsa-miR-411-5p	0.76	2.97E-06	hsa-miR-376b-3p	-1.07	2.53E-01
hsa-let-7g-3p	0.76	3.19E-01	hsa-miR-4745-5p	-1.09	4.75E-02
hsa-miR-4741	0.76	3.08E-01	hsa-miR-5696	-1.09	2.34E-01



Mature miRNA	log2 foldchange	p-value	Mature miRNA	log2 foldchange	p-value
hsa-miR-4731-3p	0.75	3.00E-01	hsa-miR-1292-5p	-1.11	1.17E-02
hsa-miR-769-5p	0.75	1.57E-07	hsa-miR-935	-1.12	2.57E-01
hsa-miR-3074-3p	0.74	2.18E-02	hsa-miR-7-5p	-1.12	1.44E-01
hsa-miR-4646-5p	0.74	4.33E-01	hsa-miR-3159	-1.12	5.57E-04
hsa-miR-766-5p	0.73	7.65E-02	hsa-miR-4786-3p	-1.13	1.44E-01
hsa-miR-377-5p	0.73	3.98E-01	hsa-miR-488-3p	-1.13	2.18E-01
hsa-miR-134-5p	0.73	9.24E-02	hsa-miR-548ay-3p	-1.14	6.10E-04
hsa-miR-3171	0.73	2.18E-02	hsa-miR-3128	-1.14	6.53E-02
hsa-miR-425-5p	0.72	5.36E-05	hsa-miR-378i	-1.14	2.39E-01
hsa-miR-675-5p	0.72	1.93E-01	hsa-miR-5690	-1.14	1.44E-08
hsa-miR-424-5p	0.71	8.20E-04	hsa-miR-586	-1.14	9.09E-02
hsa-miR-627-5p	0.70	1.86E-02	hsa-miR-4738-3p	-1.15	1.43E-01
hsa-let-7a-5p	0.70	3.54E-02	hsa-miR-556-3p	-1.16	1.37E-01
hsa-miR-148b-5p	0.69	8.76E-09	hsa-miR-1914-5p	-1.16	6.82E-02
hsa-miR-599	0.69	4.98E-01	hsa-miR-378a-3p	-1.16	6.29E-03
hsa-miR-23a-5p	0.68	1.14E-04	hsa-miR-519d-5p	-1.16	1.90E-01
hsa-miR-337-5p	0.68	4.13E-01	hsa-miR-3691-5p	-1.17	3.73E-03
hsa-miR-940	0.67	1.73E-02	hsa-miR-126-3p	-1.21	1.02E-03
hsa-miR-4653-5p	0.67	4.91E-01	hsa-miR-3652	-1.22	1.42E-01
hsa-miR-4422	0.67	4.09E-01	hsa-miR-296-3p	-1.22	2.41E-02
hsa-miR-654-3p	0.66	3.14E-03	hsa-miR-96-3p	-1.22	5.56E-03
hsa-miR-628-3p	0.66	5.95E-03	hsa-miR-641	-1.23	8.27E-10
hsa-miR-497-5p	0.66	9.63E-03	hsa-miR-452-5p	-1.23	6.90E-10
hsa-miR-2467-5p	0.66	6.67E-02	hsa-miR-4753-3p	-1.23	1.60E-01
hsa-miR-6807-3p	0.66	4.29E-01	hsa-miR-4522	-1.23	1.99E-01
hsa-miR-6842-3p	0.66	2.43E-03	hsa-miR-1273h-3p	-1.24	3.19E-04
hsa-miR-425-3p	0.65	6.57E-04	hsa-miR-6840-5p	-1.26	1.19E-02
hsa-miR-6750-3p	0.65	3.52E-01	hsa-miR-4802-3p	-1.27	1.08E-01
hsa-miR-6741-3p	0.65	2.55E-01	hsa-miR-3191-5p	-1.27	1.33E-01
hsa-miR-2277-5p	0.65	3.99E-02	hsa-miR-409-5p	-1.28	1.80E-02
hsa-miR-324-5p	0.65	7.47E-03	hsa-miR-202-5p	-1.28	2.20E-04
hsa-miR-151b	0.64	3.16E-02	hsa-miR-4659a-5p	-1.28	1.88E-01
hsa-miR-6761-5p	0.64	5.09E-01	hsa-miR-504-5p	-1.29	1.33E-04
hsa-miR-6716-3p	0.64	3.43E-01	hsa-miR-629-3p	-1.29	2.09E-05
hsa-miR-3681-5p	0.64	1.07E-02	hsa-miR-7704	-1.29	3.28E-05
hsa-miR-590-3p	0.63	1.28E-03	hsa-miR-26a-2-3p	-1.29	5.33E-15
hsa-miR-1275	0.63	2.51E-01	hsa-miR-181d-3p	-1.30	9.50E-02
hsa-miR-671-5p	0.62	1.60E-06	hsa-miR-663a	-1.37	1.44E-02
hsa-miR-4731-5p	0.62	4.72E-01	hsa-miR-15b-3p	-1.37	7.16E-15
hsa-miR-2355-3p	0.62	4.90E-01	hsa-miR-7846-3p	-1.38	3.82E-02
hsa-miR-6514-5p	0.62	4.58E-01	hsa-miR-4420	-1.39	3.33E-02
hsa-miR-4639-5p	0.62	5.29E-01	hsa-miR-3659	-1.40	1.30E-01
hsa-miR-3146	0.62	5.22E-01	hsa-miR-3144-5p	-1.40	1.51E-02
hsa-miR-6734-5p	0.60	4.70E-01	hsa-miR-1286	-1.41	1.07E-03
hsa-miR-3653	0.60	1.25E-01	hsa-miR-1292-3p	-1.42	6.99E-02
hsa-miR-6820-5p	0.59	4.55E-01	hsa-miR-139-5p	-1.43	3.40E-05
hsa-miR-675-3p	0.58	2.48E-01	hsa-miR-25-5p	-1.44	4.43E-04
hsa-miR-382-5p	0.58	3.90E-01	hsa-miR-4524a-5p	-1.44	1.38E-01
hsa-miR-615-3p	0.57	6.23E-02	hsa-miR-3150a-3p	-1.47	9.58E-03
hsa-miR-4685-3p	0.57	3.56E-01	hsa-miR-502-3p	-1.47	1.24E-06
hsa-miR-499b-3p	0.57	5.58E-01	hsa-miR-6794-3p	-1.48	9.60E-02
hsa-miR-376c-3p	0.57	2.14E-01	hsa-miR-551a	-1.48	4.45E-05
hsa-miR-6804-3p	0.56	5.36E-01	hsa-miR-4503	-1.49	7.87E-02
hsa-miR-590-5p	0.56	3.58E-02	hsa-miR-383-5p	-1.50	2.22E-03
hsa-miR-6509-5p	0.55	4.84E-01	hsa-miR-1293	-1.51	1.72E-04
hsa-miR-30a-5p	0.54	5.01E-02	hsa-miR-4804-5p	-1.53	7.49E-02

Mature miRNA	log2 foldchange	p-value	Mature miRNA	log2 foldchange	p-value
hsa-miR-937-3p	0.54	2.90E-01	hsa-miR-3929	-1.53	7.10E-02
hsa-miR-3607-5p	0.54	4.82E-01	hsa-miR-99a-5p	-1.55	3.13E-07
hsa-miR-3620-3p	0.54	3.43E-01	hsa-miR-371a-5p	-1.57	3.65E-02
hsa-miR-503-5p	0.54	1.46E-01	hsa-miR-23b-5p	-1.58	2.08E-02
hsa-miR-4667-5p	0.54	5.91E-01	hsa-miR-3944-5p	-1.59	6.02E-03
hsa-miR-4688	0.54	5.90E-01	hsa-miR-3130-5p	-1.62	3.56E-02
hsa-miR-6721-5p	0.54	5.23E-01	hsa-miR-5094	-1.63	1.93E-04
hsa-miR-181a-2-3p	0.53	2.97E-04	hsa-miR-6758-3p	-1.63	1.14E-01
hsa-miR-491-5p	0.53	3.30E-01	hsa-miR-26a-1-3p	-1.65	1.54E-05
hsa-miR-6516-3p	0.53	2.62E-01	hsa-miR-6503-3p	-1.66	1.42E-10
hsa-miR-6508-5p	0.53	5.82E-01	hsa-miR-4477b	-1.66	3.70E-06
hsa-miR-362-3p	0.53	1.89E-01	hsa-miR-4424	-1.68	5.29E-02
hsa-miR-30b-3p	0.53	1.49E-02	hsa-miR-92a-1-5p	-1.68	3.95E-06
hsa-miR-431-5p	0.52	8.83E-02	hsa-miR-4442	-1.68	8.57E-02
hsa-miR-380-3p	0.52	4.67E-01	hsa-miR-4492	-1.69	2.78E-03
hsa-miR-545-5p	0.52	1.56E-01	hsa-miR-942-3p	-1.70	8.90E-08
hsa-miR-106a-5p	0.51	1.25E-01	hsa-miR-218-1-3p	-1.70	8.27E-02
hsa-miR-532-3p	0.51	1.36E-02	hsa-miR-3117-3p	-1.76	3.99E-02
hsa-miR-6877-3p	0.50	5.64E-01	hsa-miR-100-5p	-1.77	8.71E-06
hsa-miR-192-5p	0.50	1.62E-03	hsa-miR-520f-3p	-1.83	4.78E-02
hsa-miR-140-3p	0.50	1.27E-03	hsa-miR-3150a-5p	-1.84	1.45E-08
hsa-miR-3912-5p	0.50	6.19E-01	hsa-miR-6780a-5p	-1.85	4.30E-02
hsa-miR-659-5p	0.49	1.33E-01	hsa-miR-3667-3p	-1.87	2.00E-14
hsa-miR-4515	0.49	6.18E-01	hsa-miR-1226-3p	-1.89	1.51E-09
hsa-miR-3115	0.49	4.51E-01	hsa-miR-129-1-3p	-1.91	3.55E-02
hsa-miR-99b-3p	0.49	1.21E-03	hsa-miR-4466	-1.92	9.33E-03
hsa-miR-152-3p	0.48	1.75E-02	hsa-miR-4797-5p	-1.98	4.26E-02
hsa-let-7e-5p	0.48	3.66E-04	hsa-miR-335-3p	-2.01	3.20E-27
hsa-miR-561-5p	0.48	1.73E-03	hsa-miR-373-3p	-2.01	4.53E-12
hsa-miR-30a-3p	0.47	2.73E-01	hsa-miR-584-5p	-2.02	1.71E-29
hsa-miR-186-5p	0.47	1.40E-04	hsa-miR-3150b-3p	-2.04	5.01E-06
hsa-miR-500a-3p	0.47	2.85E-02	hsa-miR-524-3p	-2.04	3.15E-02
hsa-miR-6772-3p	0.47	5.28E-01	hsa-miR-6125	-2.06	5.31E-03
hsa-miR-671-3p	0.46	2.26E-04	hsa-miR-6753-3p	-2.10	2.84E-02
hsa-miR-6810-3p	0.46	5.86E-01	hsa-miR-139-3p	-2.11	3.60E-02
hsa-miR-4713-5p	0.46	2.31E-01	hsa-miR-5189-3p	-2.14	5.56E-05
hsa-miR-1306-3p	0.46	6.12E-02	hsa-miR-664b-5p	-2.15	5.17E-09
hsa-miR-486-3p	0.45	6.31E-02	hsa-miR-3656	-2.23	3.05E-02
hsa-miR-3194-5p	0.45	7.29E-02	hsa-miR-4659a-3p	-2.29	1.09E-10
hsa-miR-3679-5p	0.45	3.93E-01	hsa-miR-5089-3p	-2.39	1.65E-02
hsa-miR-3177-5p	0.45	6.45E-01	hsa-miR-4662a-5p	-2.42	2.99E-25
hsa-miR-5009-5p	0.44	5.66E-01	hsa-miR-584-3p	-2.44	1.32E-02
hsa-let-7d-5p	0.44	8.28E-02	hsa-miR-3917	-2.47	5.24E-08
hsa-miR-1908-3p	0.44	5.56E-02	hsa-miR-3648	-2.56	7.15E-11
hsa-miR-6818-3p	0.44	6.40E-01	hsa-miR-1271-5p	-2.57	1.05E-06
hsa-miR-106b-5p	0.44	4.80E-03	hsa-miR-6763-5p	-2.60	8.25E-03
hsa-miR-4661-3p	0.43	3.18E-01	hsa-miR-3150b-5p	-2.65	1.66E-03
hsa-miR-2110	0.42	1.22E-01	hsa-miR-224-5p	-2.66	1.03E-31
hsa-miR-21-5p	0.42	9.87E-03	hsa-miR-1257	-2.68	6.05E-05
hsa-miR-6885-3p	0.41	5.94E-01	hsa-miR-6789-3p	-2.70	3.63E-03
hsa-miR-6850-5p	0.41	6.56E-01	hsa-miR-212-5p	-2.77	8.19E-22
hsa-miR-4748	0.41	6.24E-01	hsa-miR-202-3p	-2.81	2.13E-06
hsa-miR-6836-5p	0.41	5.56E-01	hsa-miR-7976	-2.83	4.87E-38
hsa-miR-744-3p	0.41	2.92E-02	hsa-miR-3140-5p	-2.85	3.64E-03
hsa-miR-4742-5p	0.41	5.13E-01	hsa-miR-6087	-2.97	3.32E-26
hsa-miR-3934-5p	0.39	4.15E-01	hsa-miR-500b-3p	-3.29	1.28E-19

Mature miRNA	log2 foldchange	p-value	Mature miRNA	log2 foldchange	p-value
hsa-let-7f-5p	0.39	6.70E-02	hsa-miR-4497	-3.32	2.97E-05
hsa-miR-6798-3p	0.39	2.97E-01	hsa-miR-488-5p	-3.56	8.72E-05
hsa-miR-4712-3p	0.38	7.02E-01	hsa-miR-1246	-3.87	2.68E-18
hsa-miR-548ar-3p	0.38	3.99E-01	hsa-miR-5091	-4.07	2.70E-05
hsa-miR-4775	0.38	3.28E-01	hsa-miR-4449	-4.59	3.72E-58
hsa-miR-4761-5p	0.37	5.33E-01	hsa-miR-4488	-4.78	9.27E-11
hsa-miR-597-5p	0.37	6.53E-01			
hsa-miR-501-5p	0.37	2.30E-01			
hsa-miR-182-3p	0.37	1.62E-01			
hsa-miR-494-3p	0.37	4.48E-01			
hsa-miR-877-3p	0.37	6.04E-01			
hsa-miR-6777-5p	0.36	7.08E-01			
hsa-miR-3909	0.36	3.30E-02			
hsa-miR-3135a	0.35	6.14E-01			
hsa-miR-324-3p	0.34	7.82E-02			
hsa-miR-636	0.34	5.28E-01			
hsa-miR-548k	0.33	2.43E-02			
hsa-miR-6820-3p	0.33	7.11E-01			
hsa-miR-6866-5p	0.32	6.96E-01			
hsa-miR-192-3p	0.32	4.70E-01			
hsa-miR-519c-3p	0.32	4.58E-01			
hsa-miR-6877-5p	0.31	7.38E-01			
hsa-miR-127-3p	0.31	1.77E-01			
hsa-miR-4772-3p	0.31	5.85E-01			
hsa-miR-323a-3p	0.31	5.38E-01			
hsa-miR-6515-3p	0.30	7.38E-01			
hsa-miR-382-3p	0.30	7.22E-01			
hsa-miR-3127-3p	0.29	6.60E-01			
hsa-miR-577	0.29	2.86E-01			
hsa-miR-6803-3p	0.29	6.27E-01			
hsa-miR-519d-3p	0.28	7.02E-01			
hsa-miR-194-5p	0.28	1.90E-01			
hsa-miR-29b-1-5p	0.28	4.70E-01			
hsa-miR-5000-3p	0.28	5.10E-01			
hsa-miR-522-3p	0.28	7.32E-01			
hsa-miR-26b-3p	0.27	9.60E-02			
hsa-miR-3140-3p	0.27	5.95E-01			
hsa-miR-579-3p	0.26	6.22E-01			
hsa-miR-3668	0.26	6.67E-01			
hsa-miR-3682-3p	0.26	7.77E-01			
hsa-miR-365a-5p	0.26	7.39E-01			
hsa-miR-6742-3p	0.25	6.97E-01			
hsa-miR-98-5p	0.25	1.36E-01			
hsa-miR-92b-3p	0.25	9.78E-02			
hsa-miR-182-5p	0.25	3.95E-02			
hsa-miR-4677-5p	0.25	4.52E-01			
hsa-miR-1296-3p	0.25	7.01E-01			
hsa-miR-127-5p	0.24	7.13E-01			
hsa-miR-5585-5p	0.24	7.97E-01			
hsa-miR-450b-5p	0.24	1.59E-01			
hsa-miR-381-3p	0.24	2.21E-01			
hsa-miR-199b-5p	0.24	2.83E-01			
hsa-miR-523-3p	0.24	6.69E-01			
hsa-miR-1291	0.24	4.82E-01			
hsa-miR-6840-3p	0.24	8.04E-01			
hsa-miR-548u	0.23	7.03E-01			



Mature miRNA	log2 foldchange	p-value	Mature miRNA	log2 foldchange	p-value
hsa-miR-31-5p	0.23	7.03E-01			
hsa-miR-6812-3p	0.23	7.10E-01			
hsa-miR-767-5p	0.23	3.07E-02			
hsa-miR-431-3p	0.22	7.54E-01			
hsa-miR-151a-3p	0.22	7.93E-02			
hsa-let-7i-5p	0.22	2.50E-01			
hsa-miR-1185-1-3p	0.22	7.78E-01			
hsa-miR-6505-5p	0.22	8.17E-01			
hsa-miR-200a-5p	0.22	8.17E-01			
hsa-miR-4772-5p	0.21	3.52E-01			
hsa-miR-493-5p	0.21	5.21E-01			
hsa-miR-3129-3p	0.21	8.18E-01			
hsa-miR-615-5p	0.21	6.04E-01			
hsa-miR-4660	0.21	7.55E-01			
hsa-miR-3605-5p	0.20	6.50E-01			
hsa-miR-125b-2-3p	0.20	7.09E-01			
hsa-miR-101-3p	0.20	2.95E-01			
hsa-miR-3121-3p	0.19	7.68E-01			
hsa-miR-4690-3p	0.19	7.99E-01			
hsa-miR-193a-5p	0.19	5.98E-01			
hsa-miR-3124-5p	0.19	8.04E-01			
hsa-let-7b-3p	0.19	8.33E-01			
hsa-miR-345-5p	0.18	1.23E-01			
hsa-miR-3679-3p	0.18	8.59E-01			
hsa-miR-33b-3p	0.17	3.74E-01			
hsa-miR-193a-3p	0.17	6.96E-01			
hsa-miR-548b-3p	0.17	4.76E-01			
hsa-miR-6739-3p	0.17	8.50E-01			
hsa-miR-1180-5p	0.16	8.47E-01			
hsa-miR-518e-3p	0.16	8.07E-01			
hsa-miR-423-3p	0.15	3.03E-01			
hsa-miR-516b-5p	0.15	6.81E-01			
hsa-miR-188-5p	0.15	5.43E-01			
hsa-miR-6777-3p	0.14	7.80E-01			
hsa-miR-6727-5p	0.14	8.75E-01			
hsa-miR-627-3p	0.14	6.16E-01			
hsa-miR-183-5p	0.13	5.31E-01			
hsa-miR-6749-3p	0.13	8.55E-01			
hsa-miR-98-3p	0.13	8.53E-01			
hsa-miR-362-5p	0.13	5.71E-01			
hsa-miR-524-5p	0.13	8.79E-01			
hsa-miR-4652-5p	0.12	7.11E-01			
hsa-miR-589-3p	0.12	4.39E-01			
hsa-miR-33a-3p	0.12	6.11E-01			
hsa-miR-5010-3p	0.12	7.33E-01			
hsa-let-7b-5p	0.12	6.34E-01			
hsa-miR-1307-5p	0.11	5.42E-01			
hsa-miR-6868-3p	0.11	8.72E-01			
hsa-miR-520g-3p	0.11	8.92E-01			
hsa-miR-2355-5p	0.10	8.51E-01			
hsa-miR-548e-3p	0.10	6.68E-01			
hsa-miR-1247-5p	0.10	9.13E-01			
hsa-miR-1307-3p	0.10	5.00E-01			
hsa-miR-92b-5p	0.10	6.94E-01			
hsa-miR-505-5p	0.09	8.12E-01			
hsa-miR-93-5p	0.09	3.56E-01			

Mature miRNA	log2 foldchange	p-value	Mature miRNA	log2 foldchange	p-value
hsa-miR-539-3p	0.09	8.78E-01			
hsa-miR-4511	0.08	8.37E-01			
hsa-miR-502-5p	0.08	7.69E-01			
hsa-miR-5587-5p	0.08	9.24E-01			
hsa-miR-183-3p	0.08	6.68E-01			
hsa-miR-15b-5p	0.07	7.38E-01			
hsa-miR-16-5p	0.07	8.39E-01			
hsa-miR-4635	0.07	9.23E-01			
hsa-miR-654-5p	0.07	9.30E-01			
hsa-miR-320a	0.07	6.03E-01			
hsa-miR-101-5p	0.07	7.32E-01			
hsa-miR-152-5p	0.06	8.88E-01			
hsa-miR-3138	0.06	9.26E-01			
hsa-miR-122-5p	0.06	9.44E-01			
hsa-let-7g-5p	0.06	6.51E-01			
hsa-miR-532-5p	0.06	6.82E-01			
hsa-miR-4645-3p	0.06	9.50E-01			
hsa-miR-449c-5p	0.06	8.80E-01			
hsa-miR-4661-5p	0.05	8.08E-01			
hsa-miR-3173-5p	0.05	9.23E-01			
hsa-miR-6786-3p	0.05	9.49E-01			
hsa-miR-758-3p	0.05	8.81E-01			
hsa-miR-135b-3p	0.05	8.72E-01			
hsa-miR-193b-3p	0.04	8.11E-01			
hsa-miR-6846-3p	0.03	9.74E-01			
hsa-miR-6515-5p	0.03	9.71E-01			
hsa-miR-129-2-3p	0.03	9.45E-01			
hsa-miR-4465	0.03	9.47E-01			
hsa-miR-6853-3p	0.03	9.72E-01			
hsa-miR-4687-3p	0.03	9.69E-01			
hsa-miR-3609	0.03	8.83E-01			
hsa-miR-3944-3p	0.03	9.59E-01			
hsa-miR-6729-3p	0.02	9.87E-01			
hsa-miR-6733-3p	0.02	9.86E-01			
hsa-miR-4706	0.01	9.89E-01			
hsa-miR-589-5p	0.01	9.09E-01			
hsa-miR-767-3p	0.01	9.54E-01			
hsa-miR-1268b	0.01	9.89E-01			
hsa-miR-130b-3p	0.01	9.44E-01			
hsa-miR-561-3p	0.00	9.98E-01			

---

## 7.2. Danksagung

Ich möchte mich bei Prof. Dr. Jörn Lausen bedanken, dass er mir ermöglichte an diesem interessanten Thema zu forschen und meine Promotionsarbeit in seiner Arbeitsgruppe am Georg-Speyer-Haus durchführen zu können. Ausserdem möchte ich mich für die Diskussionsbereitschaft bedanken, die mich mit vielen daraus resultierenden Anregungen und Ideen vorangebracht hat.

Bei Prof. Dr. Winfried Wels möchte ich mich für die Betreuung meiner Promotionsarbeit am Georg-Speyer-Haus bedanken.

Mein Dank gilt ebenfalls Prof. Dr. Beatrix Süß, die mich seitens der TU Darmstadt betreute und immer ein offenes Ohr für mich hatte. Bei Prof. Laube und Prof. Thiel möchte ich bedanken, dass sie bereit erklären, an meiner Disputation teilzunehmen.

Bei meiner gesamten Arbeitsgruppe bedanke ich mich für ihre Unterstützung während meiner Promotionsarbeit sowie der gemeinsamen Zeit inklusive vieler anregender, interessanter aber auch humorvoller Diskussionen. Bei Nadine Courtial und Julia Herglotz möchte ich mich für ihre Hilfsbereitschaft zu Beginn der Promotionszeit bedanken. Olga Lausen danke ich für ihre fachliche Unterstützung und Helge Houssong dafür, dass sie für alle Probleme im Laboralltag eine Lösung hatte. Besonders möchte ich mich bei Stephan Kolodziej, Stefanie Herkt und Jasmin Yillah bedanken. Die vielen interessanten und hilfreichen Diskussionen aber vor allem auch lustigen und humorvollen Momente mit Euch haben vieles erleichtert. Ganz lieben Dank dafür! Ausserdem möchte ich mich ebenfalls bei den Kollegen der AG Wels, AG Koch, AG Zörnig und AG Grez für ihre kontinuierliche Bereitschaft bedanken, bei kritischen Fragestellungen stets als Gesprächspartner zur Verfügung zu stehen. Die gemeinsamen Freizeitaktivitäten mit den Kollegen des Georg Speyer Hauses haben uns über die Grenzen der Arbeitsgruppen hinweg zu einem tollen Team wachsen lassen.

Prof. Halvard Bönig und Frau Christiane Hümmer möchte ich für die Bereitstellung der humanen CD34-Zellen danken. Bei Prof. Dr. Boris Fehse möchte ich mich bedanken, dass ich den lentiviralen Vektor pLeGO-iG2 für meine Studien verwenden konnte.

Ein ganz herzliches Dankeschön geht natürlich an meine Familie, die mir in jeglicher Phase meiner Doktorarbeit mit unterstützenden und aufmunternden Worten und Taten zur Seite gestanden hat.

---

## 7.3. Veröffentlichungen

### 7.3.1. Publikationen

Kolodziej S, Kuvardina ON, Oellerich T, Herglotz J, Backert I, **Kohrs N**, Buscató EI, Wittmann SK, Salinas-Riester G, Bonig H, Karas M, Serve H, Proschak E, Lausen J. *PADI4 acts as a coactivator of Tal1 by counteracting repressive histone arginine methylation*. Nat Commun., 2014. 5:3995 doi: 10.1038/ncomms4995

Ponnusamy K, **Kohrs N**, Ptasinska A, Assi SA, Herold T, Hiddemann W, Lausen J, Bonifer C, Henschler R, Wichmann C. *RUNX1/ETO blocks selectin-mediated adhesion via epigenetic silencing of PSGL-1*. Oncogenesis, 2015 4:e146 doi: 10.1038/oncsis.2015.6

Kuvardina ON, Herglotz J, Kolodziej S, **Kohrs N**, Herkt S, Wojcik B, Oellerich T, Corso J, Behrens K, Kumar A, Hussong H, Urlaub H, Koch J, Serve H, Bonig H, Stocking C, Rieger MA, Lausen J. *RUNX1 represses the erythroid gene expression program during megakaryocytic differentiation*. Blood, 2015. 125(23):3570-9. doi: 10.1182/blood-2014-11-610519

**Kohrs N**, Kolodziej S, Kuvardina ON, Herglotz J, Yillah J, Herkt S, Piechatzek A, Salinas Riester G, Lingner T, Wichmann C, Bonig H, Seifried E, Platzbecker U, Medyouf H, Grez M, Lausen J. *MiR144/451 Expression Is Repressed by RUNX1 During Megakaryopoiesis and Disturbed by RUNX1/ETO*. PLoS Genet., 2016. 12(3):e1005946. doi: 10.1371/journal.pgen.1005946

Kuvardina ON, Herkt S, Meyer A, Schneider L, Yillah J, **Kohrs N**, Bonig H, Seifried E, Müller-Tidow C, Lausen J. *Hematopoietic transcription factors and differential cofactor binding regulate PRKACB isoform expression*. Oncotarget, 2017. 8(42):71685-71698. doi: 10.18632/oncotarget.17386.

---

### 7.3.2. Posterpräsentationen

**Kohrs N**, Bölling O, Wichmann C, Grez M, Lausen J (2011) The influence of the leukemic fusion protein RUNX1-ETO on target genes of the transcription factor Tal1. UCT Science Day, Frankfurt am Main

**Kohrs N**, Kuvardina ON, Wichmann C, Grez M, Lausen J (2012) The influence of the leukemic fusion protein RUNX1-ETO on target genes of the transcription factor Tal1. UCT Science Day, Frankfurt am Main

**Kohrs N**, Kuvardina ON, Wichmann C, Grez M, Lausen J (2012) Kofaktor-Rekrutierung und DNA-Bindung des leukämischen Fusionsproteins RUNX1/ETO als Ansatzpunkt für eine molekulare Therapie. LOEWE Onkogene Signaltransduktion Frankfurt (OSF), Frankfurt am Main

Yillah J, Kolodziej S, **Kohrs N**, Heidelberger JB, Oellerich T, Lausen J. (2013) Analysis of posttranslational modification crosstalk of the transcription factor Tal1 and the influence of p38 signaling. UCT Science Day, Frankfurt am Main

**Kohrs N**, Kolodziej S, Kuvardina ON, Herkt S, Wichmann C, Grez M, Lausen J (2014) Transcriptional regulation of the microRNA cluster 144-451 during hematopoiesis and leukemogenesis. UCT Science Day, Frankfurt am Main

Yillah J, Kolodziej S, **Kohrs N**, Kuvardina ON, Herglotz J, Heidelberger JB, Oellerich T, Lausen J. (2014) Regulation of Tal1 by arginine methylation and a potential posttranslational modification crosstalk. UCT Science Day, Frankfurt am Main

---

## 7.4. Lebenslauf

### Persönliche Angaben

Name: Nicole Sahner; geb. Kohrs  
Geburtsdatum: 13.12.1985  
Geburtsort: Hagenow  
Staatsangehörigkeit: Deutsch

### Praktische Erfahrungen

12/2017 – heute      Product Development Engineer,  
SCHOTT Schweiz AG, St. Gallen

### Akademische Ausbildung

01/2011 – 12/2015      Promotion in der Arbeitsgruppe von Dr. Jörn Lausen,  
Georg Speyer Haus, Institut für Tumorbologie und  
experimentelle Therapie, Frankfurt am Main  
  
Thema: „Transkriptionelle Regulation des microRNA  
Clusters 144-451 während der Hämatopoese sowie  
Leukämogenese“  
  
12/2009 – 09/2010      Diplomarbeit im Institut für Biochemie in der  
Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Bernd Ludwig,  
Goethe-Universität, Frankfurt am Main  
  
Thema: „Aufreinigungsstrategien der Cytochrom  
*caa<sub>3</sub>* Oxidase aus *Thermus thermophilus*“  
  
10/2005 – 09/2010      Studium der Biochemie an der Goethe-Universität,  
Frankfurt am Main

### Schulischer Werdegang

08/1996 – 04/2005      Allgemeine Hochschulreife,  
Robert-Stock-Gymnasium Hagenow  
  
09/1992 – 06/1996      Grundschule Hagenow

---

## 7.5. Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit entsprechend den Regeln guter wissenschaftlicher Praxis selbstständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter angefertigt habe.

Sämtliche aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sowie sämtliche von Anderen direkt oder indirekt übernommenen Daten, Techniken und Materialien sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher bei keiner anderen Hochschule zu Prüfungszwecken eingereicht.

St. Gallen, den 25.07.2019

Nicole Salner

---

## Abkürzungsverzeichnis

% (v/v)	Volumenprozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
α	anti
Abb.	Abbildung
ac	Acetylierung
AGM	Region der Aorten, Gonaden und des Mesonephros
AMP	Ampicillin
AGO1-4	Argonaute-Proteine 1-4
ALL	akuten lymphatischen Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
AMP	Ampicillin
Baso-E	basophile Erythroblasten
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
Bsp., z.B.	(zum) Beispiel
bzw.	beziehungsweise
BFU-E	burst forming unit-erythrocyte
B-CLL	B-Zell chronischen lymphatischen Leukämie
ca.	circa
CAR	chimeric antigen receptor
CD	cluster of differentiation
cDNA	komplementäre DNA
CFU	Colony Formation Units
CFU-E	colony-forming units-erythrocyte
ChIP	Chromatin-Immunopräzipitation
CLP	common lymphoid progenitor
cm	Zentimeter
CMP	common myeloid progenitor
CMV	Cytomegalievirus
d	Tag
Da	Dalton
d.h.	das heißt
DMEM	Dulbecco's modified medium
DMSO	Dimethylsulfoxid



DNA	desoxyribonucleic acid
DNMT1	DNA-Methyltransferase 1
DGCR8	DiGeorge syndrome critical region 8
DTT	Dithiothreitol
EPO	Erythropoetin
EPOR	Erythropoetinrezeptor
ETO	Eight-Twenty-One
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Flt-3	FMS-like tyrosine kinase 3
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FCS	Fetal Calf Serum
g	Gramm
G-CSF	granulocyte colony-stimulating factor
GM-CSF	granulocyte macrophage colony-stimulating factor
h	Stunde
H1	Histon 1
H2	Histon 2
H3	Histon 3
H4	Histon 4
H5	Histon 5
H3K4	Lysin 4 des Histons 3
H3K9	Lysin 9 des Histons 3
H3K27	Lysin 27 des Histons 3
H3R2	Arginin 2 des Histons 3
HDAC	Histone-Deacetylase
HSC	Hämatopoietische Stammzelle (hematopoietic stem cell)
IL	Interleukin
IP	Immunopräzipitation
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kDa	Kilodalton
LT-HSC	Langzeit-repopulierende hämatopoietische Stammzelle (long-term HSC)
M-CSF	macrophage colony-stimulating factor
me	Methylierung
me2	Dimethylierung
me3	Trimethylierung
min	Minuten
miR	microRNA
MEP	megakaryozytäre/erythroide Vorläuferzelle

MPP	multipotenten Vorläuferzelle (multipotent progenitor cell)
RNA-Pol. II	RNA-Polymerase II
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SCF	Stammzellfaktor
SDS	Natriumdodecylsulfat
shRNA	Short hairpin ribonucleic acid
ST-HSC	Kurzzeit-repopulierende hämatopoietische Stammzelle (short-term HSC)
ONPG	o-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranosid
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
PEI	Polyethylenimin
PRMT	Protein Arginin Methyltransferase
RE	RUNX1-ETO
REtr	RUNX1-ETOf
RNA	Ribonucleic acid
TPA	TPA 12-o-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat
TPO	Thrombopoetin
WT	Wildtyp

---

## Literaturverzeichnis

1. Orkin, S.H. and L.I. Zon, *Hematopoiesis: An evolving paradigm for stem cell biology*. Cell, 2008. **132**(4): p. 631-644.
2. Antoniani, C., O. Romano, and A. Miccio, *Concise Review: Epigenetic Regulation of Hematopoiesis: Biological Insights and Therapeutic Applications*. Stem Cells Translational Medicine, 2017. **6**(12): p. 2106-2114.
3. Hall, M.A., et al., *The critical regulator of embryonic hematopoiesis, SCL, is vital in the adult for megakaryopoiesis, erythropoiesis, and lineage choice in CFU-S12*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(3): p. 992-7.
4. Chen, M.J., et al., *Runx1 is required for the endothelial to haematopoietic cell transition but not thereafter*. Nature, 2009. **457**(7231): p. 887-91.
5. Havelange, V. and R. Garzon, *MicroRNAs: emerging key regulators of hematopoiesis*. Am J Hematol, 2010. **85**(12): p. 935-42.
6. Bruchova, H., et al., *Regulated expression of microRNAs in normal and polycythemia vera erythropoiesis*. Experimental Hematology, 2007. **35**(11): p. 1657-1667.
7. Dore, L.C., et al., *A GATA-1-regulated microRNA locus essential for erythropoiesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(9): p. 3333-8.
8. Su, Z., et al., *MiR-451, a potential prognostic biomarker and tumor suppressor for gastric cancer*. Int J Clin Exp Pathol, 2015. **8**(8): p. 9154-60.
9. Xu, H., et al., *Tumor-Suppressing Effects of miR451 in Human Osteosarcoma*. Cell Biochemistry and Biophysics, 2014. **69**(1): p. 163-168.
10. Nucifora, G., et al., *Detection of DNA rearrangements in the AML1 and ETO loci and of an AML1/ETO fusion mRNA in patients with t(8;21) acute myeloid leukemia*. Blood, 1993. **81**(4): p. 883-8.
11. Kozu, T., et al., *Junctions of the AML1/MTG8(ETO) fusion are constant in t(8;21) acute myeloid leukemia detected by reverse transcription polymerase chain reaction*. Blood, 1993. **82**(4): p. 1270-6.
12. Gelmetti, V., et al., *Aberrant recruitment of the nuclear receptor corepressor-histone deacetylase complex by the acute myeloid leukemia fusion partner ETO*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(12): p. 7185-91.
13. Zhuang, W.Y., et al., *Epigenetic silencing of Bcl-2, CEBPA and p14(ARF) by the AML1-ETO oncoprotein contributing to growth arrest and differentiation block in the U937 cell line*. Oncol Rep, 2013. **30**(1): p. 185-92.
14. Wang, L., et al., *The leukemogenicity of AML1-ETO is dependent on site-specific lysine acetylation*. Science, 2011. **333**(6043): p. 765-9.
15. Galloway, J.L. and L.I. Zon, *3 Ontogeny of hematopoiesis: Examining the emergence of hematopoietic cells in the vertebrate embryo*, in *Current Topics in Developmental Biology*. 2003, Academic Press. p. 139-158.
16. Palis, J. and M.C. Yoder, *Yolk-sac hematopoiesis: The first blood cells of mouse and man*. Experimental Hematology, 2001. **29**(8): p. 927-936.
17. Cumano, A. and I. Godin, *Ontogeny of the Hematopoietic System*. Annual Review of Immunology, 2007. **25**(1): p. 745-785.
18. Calvi, L.M., et al., *Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche*. Nature, 2003. **425**(6960): p. 841-846.
19. Morrison, S.J. and I.L. Weissman, *The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype*. Immunity, 1994. **1**(8): p. 661-73.
20. Kondo, M., I.L. Weissman, and K. Akashi, *Identification of Clonogenic Common Lymphoid Progenitors in Mouse Bone Marrow*. Cell, 1997. **91**(5): p. 661-672.

21. Akashi, K., et al., *A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages*. *Nature*, 2000. **404**(6774): p. 193-197.
22. Flygare, J., et al., *HIF1alpha synergizes with glucocorticoids to promote BFU-E progenitor self-renewal*. *Blood*, 2011. **117**(12): p. 3435-44.
23. Liu, J., X. Han, and X. An, *Novel methods for studying normal and disordered erythropoiesis*. *Sci China Life Sci*, 2015. **58**(12): p. 1270-5.
24. Koury, M.J. and M.C. Bondurant, *Maintenance by erythropoietin of viability and maturation of murine erythroid precursor cells*. *J Cell Physiol*, 1988. **137**(1): p. 65-74.
25. McGrath, K.E., et al., *Enucleation of primitive erythroid cells generates a transient population of "pyrenocytes" in the mammalian fetus*. *Blood*, 2008. **111**(4): p. 2409-17.
26. Chasis, J.A., et al., *Membrane assembly and remodeling during reticulocyte maturation*. *Blood*, 1989. **74**(3): p. 1112-20.
27. Dzierzak, E. and S. Philipsen, *Erythropoiesis: development and differentiation*. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2013. **3**(4): p. a011601.
28. Barminko, J., B. Reinholt, and M.H. Baron, *Development and differentiation of the erythroid lineage in mammals*. *Dev Comp Immunol*, 2016. **58**: p. 18-29.
29. Metcalf, D., *Hematopoietic cytokines*. *Blood*, 2008. **111**(2): p. 485-91.
30. Koury, M.J. and M.C. Bondurant, *Erythropoietin retards DNA breakdown and prevents programmed death in erythroid progenitor cells*. *Science*, 1990. **248**(4953): p. 378-81.
31. Livnah, O., et al., *Crystallographic evidence for preformed dimers of erythropoietin receptor before ligand activation*. *Science*, 1999. **283**(5404): p. 987-90.
32. Krause, D.S., et al., *CD34: structure, biology, and clinical utility*. *Blood*, 1996. **87**(1): p. 1-13.
33. Drenou, B., *Flow cytometry for CD34 determination in hematopoietic grafts*. *Hematol Cell Ther*, 1996. **38**(6): p. 505-12.
34. Phillips, D.R., et al., *The platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex*. *Blood*, 1988. **71**(4): p. 831-43.
35. Kaushansky, K., *Thrombopoietin and its receptor in normal and neoplastic hematopoiesis*. *Thromb J*, 2016. **14**(Suppl 1): p. 40.
36. Dong, H.Y., S. Wilkes, and H. Yang, *CD71 is selectively and ubiquitously expressed at high levels in erythroid precursors of all maturation stages: a comparative immunochemical study with glycophorin A and hemoglobin A*. *Am J Surg Pathol*, 2011. **35**(5): p. 723-32.
37. Okumura, N., K. Tsuji, and T. Nakahata, *Changes in cell surface antigen expressions during proliferation and differentiation of human erythroid progenitors*. *Blood*, 1992. **80**(3): p. 642-50.
38. Rieger, M.A. and T. Schroeder, *Hematopoiesis*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2012. **4**(12).
39. Robb, L., *Cytokine receptors and hematopoietic differentiation*. *Oncogene*, 2007. **26**(47): p. 6715-23.
40. Babovic, S. and C.J. Eaves, *Hierarchical organization of fetal and adult hematopoietic stem cells*. *Experimental Cell Research*, 2014. **329**(2): p. 185-191.
41. Starck, J., et al., *Functional cross-antagonism between transcription factors FLI-1 and EKLF*. *Mol Cell Biol*, 2003. **23**(4): p. 1390-402.
42. Kim, S.I. and E.H. Bresnick, *Transcriptional control of erythropoiesis: emerging mechanisms and principles*. *Oncogene*, 0000. **26**(47): p. 6777-6794.
43. Orkin, S.H., *Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages*. *Nat Rev Genet*, 2000. **1**(1): p. 57-64.
44. Chrivia, J.C., et al., *Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP*. *Nature*, 1993. **365**(6449): p. 855-859.
45. Crispino, J.D., *GATA1 in normal and malignant hematopoiesis*. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2005. **16**(1): p. 137-147.
46. Wickrema, A. and J.D. Crispino, *Erythroid and megakaryocytic transformation*. *Oncogene*, 2007. **26**(47): p. 6803-15.

47. Hsu, H.L., et al., *Preferred sequences for DNA recognition by the TAL1 helix-loop-helix proteins*. Mol Cell Biol, 1994. **14**(2): p. 1256-65.
48. Porcher, C., et al., *The T cell leukemia oncoprotein SCL/tal-1 is essential for development of all hematopoietic lineages*. Cell, 1996. **86**(1): p. 47-57.
49. Begley, C.G., et al., *Chromosomal translocation in a human leukemic stem-cell line disrupts the T-cell antigen receptor delta-chain diversity region and results in a previously unreported fusion transcript*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(6): p. 2031-5.
50. Chen, Q., et al., *THE TAL-GENE UNDERGOES CHROMOSOME-TRANSLOCATION IN T-CELL LEUKEMIA AND POTENTIALLY ENCODES A HELIX LOOP HELIX PROTEIN*. Embo Journal, 1990. **9**(2): p. 415-424.
51. Kallianpur, A.R., J.E. Jordan, and S.J. Brandt, *The SCL/TAL-1 gene is expressed in progenitors of both the hematopoietic and vascular systems during embryogenesis*. Blood, 1994. **83**(5): p. 1200-8.
52. Herblot, S., et al., *SCL and LMO1 alter thymocyte differentiation: inhibition of E2A-HEB function and pre-T alpha chain expression*. Nat Immunol, 2000. **1**(2): p. 138-44.
53. Morrison, S.J., N. Uchida, and I.L. Weissman, *The biology of hematopoietic stem cells*. Annu Rev Cell Dev Biol, 1995. **11**: p. 35-71.
54. Robb, L., et al., *Absence of yolk sac hematopoiesis from mice with a targeted disruption of the scl gene*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(15): p. 7075-9.
55. Lowry, J.A. and W.R. Atchley, *Molecular evolution of the GATA family of transcription factors: conservation within the DNA-binding domain*. J Mol Evol, 2000. **50**(2): p. 103-15.
56. Martin, D.I., et al., *Expression of an erythroid transcription factor in megakaryocytic and mast cell lineages*. Nature, 1990. **344**(6265): p. 444-7.
57. Takai, J., et al., *The Gata1 5' region harbors distinct cis-regulatory modules that direct gene activation in erythroid cells and gene inactivation in HSCs*. Blood, 2013. **122**(20): p. 3450-60.
58. Cantor, A.B. and S.H. Orkin, *Coregulation of GATA factors by the Friend of GATA (FOG) family of multitype zinc finger proteins*. Seminars in Cell & Developmental Biology, 2005. **16**(1): p. 117-128.
59. Tsang, A.P., et al., *FOG, a Multitype Zinc Finger Protein, Acts as a Cofactor for Transcription Factor GATA-1 in Erythroid and Megakaryocytic Differentiation*. Cell, 1997. **90**(1): p. 109-119.
60. Mehaffey, M.G., et al., *X-linked thrombocytopenia caused by a novel mutation of GATA-1*. Blood, 2001. **98**(9): p. 2681-8.
61. Wechsler, J., et al., *Acquired mutations in GATA1 in the megakaryoblastic leukemia of Down syndrome*. Nat Genet, 2002. **32**(1): p. 148-52.
62. Nichols, K.E., et al., *Familial dyserythropoietic anaemia and thrombocytopenia due to an inherited mutation in GATA1*. Nat Genet, 2000. **24**(3): p. 266-70.
63. Fujiwara, Y., et al., *Arrested development of embryonic red cell precursors in mouse embryos lacking transcription factor GATA-1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(22): p. 12355-8.
64. Shivdasani, R.A., et al., *A lineage-selective knockout establishes the critical role of transcription factor GATA-1 in megakaryocyte growth and platelet development*. Embo j, 1997. **16**(13): p. 3965-73.
65. Kagoshima, H., et al., *The Runt domain identifies a new family of heteromeric transcriptional regulators*. Trends Genet, 1993. **9**(10): p. 338-41.
66. Petrovick, M.S., et al., *Multiple functional domains of AML1: PU.1 and C/EBPalpha synergize with different regions of AML1*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(7): p. 3915-25.
67. Elagib, K.E., et al., *RUNX1 and GATA-1 coexpression and cooperation in megakaryocytic differentiation*. Blood, 2003. **101**(11): p. 4333-41.
68. Meyers, S., J.R. Downing, and S.W. Hiebert, *Identification of AML-1 and the (8;21) translocation protein (AML-1/ETO) as sequence-specific DNA-binding proteins: the runt homology domain is required for DNA binding and protein-protein interactions*. Mol Cell Biol, 1993. **13**(10): p. 6336-45.

69. Kitabayashi, I., et al., *Interaction and functional cooperation of the leukemia-associated factors AML1 and p300 in myeloid cell differentiation*. EMBO J, 1998. **17**(11): p. 2994-3004.
70. Lutterbach, B., et al., *A Mechanism of Repression by Acute Myeloid Leukemia-1, the Target of Multiple Chromosomal Translocations in Acute Leukemia*. Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(1): p. 651-656.
71. Zeng, C., et al., *Identification of a nuclear matrix targeting signal in the leukemia and bone-related AML/CBF-alpha transcription factors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(13): p. 6746-51.
72. Okada, H., et al., *AML1(-/-) embryos do not express certain hematopoiesis-related gene transcripts including those of the PU.1 gene*. Oncogene, 1998. **17**(18): p. 2287-93.
73. Gowney, J.D., et al., *Loss of Runx1 perturbs adult hematopoiesis and is associated with a myeloproliferative phenotype*. Blood, 2005. **106**(2): p. 494-504.
74. Ichikawa, M., et al., *AML-1 is required for megakaryocytic maturation and lymphocytic differentiation, but not for maintenance of hematopoietic stem cells in adult hematopoiesis*. Nat Med, 2004. **10**(3): p. 299-304.
75. Golub, T.R., et al., *Fusion of the TEL gene on 12p13 to the AML1 gene on 21q22 in acute lymphoblastic leukemia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(11): p. 4917-21.
76. Liu, P., et al., *Fusion between transcription factor CBF beta/PEBP2 beta and a myosin heavy chain in acute myeloid leukemia*. Science, 1993. **261**(5124): p. 1041-4.
77. Meyers, S., N. Lenny, and S.W. Hiebert, *The t(8;21) fusion protein interferes with AML-1B-dependent transcriptional activation*. Mol Cell Biol, 1995. **15**(4): p. 1974-82.
78. Berger, S.L., et al., *An operational definition of epigenetics*. Genes Dev, 2009. **23**(7): p. 781-3.
79. Huang, C., M. Xu, and B. Zhu, *Epigenetic inheritance mediated by histone lysine methylation: maintaining transcriptional states without the precise restoration of marks?* Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2013. **368**(1609): p. 20110332.
80. D'Urso, A. and J.H. Brickner, *Mechanisms of epigenetic memory*. Trends Genet, 2014. **30**(6): p. 230-6.
81. Cheung, P., C.D. Allis, and P. Sassone-Corsi, *Signaling to chromatin through histone modifications*. Cell, 2000. **103**(2): p. 263-71.
82. Jansen, A. and K.J. Verstrepen, *Nucleosome positioning in Saccharomyces cerevisiae*. Microbiol Mol Biol Rev, 2011. **75**(2): p. 301-20.
83. Luger, K., et al., *Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution*. Nature, 1997. **389**(6648): p. 251-60.
84. Hamiche, A., et al., *Linker histone-dependent DNA structure in linear mononucleosomes*. J Mol Biol, 1996. **257**(1): p. 30-42.
85. Syed, S.H., et al., *Single-base resolution mapping of H1-nucleosome interactions and 3D organization of the nucleosome*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(21): p. 9620-5.
86. Woodcock, C.L. and S. Dimitrov, *Higher-order structure of chromatin and chromosomes*. Curr Opin Genet Dev, 2001. **11**(2): p. 130-5.
87. Arents, G. and E.N. Moudrianakis, *Topography of the histone octamer surface: repeating structural motifs utilized in the docking of nucleosomal DNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(22): p. 10489-93.
88. Du, J. and D.J. Patel, *Structural biology-based insights into combinatorial readout and crosstalk among epigenetic marks*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1839**(8): p. 719-27.
89. Cosgrove, M.S., J.D. Boeke, and C. Wolberger, *Regulated nucleosome mobility and the histone code*. Nat Struct Mol Biol, 2004. **11**(11): p. 1037-43.
90. Kouzarides, T., *Chromatin modifications and their function*. Cell, 2007. **128**(4): p. 693-705.
91. Strahl, B.D. and C.D. Allis, *The language of covalent histone modifications*. Nature, 2000. **403**(6765): p. 41-5.
92. Zhang, W., et al., *Essential and redundant functions of histone acetylation revealed by mutation of target lysines and loss of the Gcn5p acetyltransferase*. EMBO J, 1998. **17**(11): p. 3155-67.



93. Pazin, M.J. and J.T. Kadonaga, *What's up and down with histone deacetylation and transcription?* Cell, 1997. **89**(3): p. 325-8.
94. Shah, A., et al., *Survival and cure of acute myeloid leukaemia in England, 1971-2006: a population-based study.* Br J Haematol, 2013. **162**(4): p. 509-16.
95. Dohner, H., D.J. Weisdorf, and C.D. Bloomfield, *Acute Myeloid Leukemia.* N Engl J Med, 2015. **373**(12): p. 1136-52.
96. Gale, R.P., J.M. Bennett, and F.O. Hoffman, *Therapy-related AML: A slip of the lip can sink a ship.* Leukemia Research, 2014. **38**(3): p. 418-420.
97. Dohner, H., et al., *Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet.* Blood, 2010. **115**(3): p. 453-74.
98. Patel, J.P., et al., *Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia.* N Engl J Med, 2012. **366**(12): p. 1079-89.
99. Gilliland, D.G. and J.D. Griffin, *The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia.* Blood, 2002. **100**(5): p. 1532-42.
100. Kelly, L.M. and D.G. Gilliland, *Genetics of myeloid leukemias.* Annu Rev Genomics Hum Genet, 2002. **3**: p. 179-98.
101. Takahashi, S., *Current findings for recurring mutations in acute myeloid leukemia.* J Hematol Oncol, 2011. **4**: p. 36.
102. Bennett, J.M., et al., *Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group.* Br J Haematol, 1976. **33**(4): p. 451-8.
103. Arber, D.A., et al., *The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia.* Blood, 2016. **127**(20): p. 2391-405.
104. De Kouchkovsky, I. and M. Abdul-Hay, *'Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update'.* Blood Cancer J, 2016. **6**(7): p. e441.
105. Heilmeier, B., et al., *[Diagnostics, classification and prognostic criteria of acute myeloid leukemia].* Med Klin (Munich), 2007. **102**(4): p. 296-308.
106. Fernandez, H.F., et al., *Anthracycline dose intensification in acute myeloid leukemia.* N Engl J Med, 2009. **361**(13): p. 1249-59.
107. Lowenberg, B., et al., *High-dose daunorubicin in older patients with acute myeloid leukemia.* N Engl J Med, 2009. **361**(13): p. 1235-48.
108. Klepin, H.D., *Geriatric perspective: how to assess fitness for chemotherapy in acute myeloid leukemia.* Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2014. **2014**(1): p. 8-13.
109. Estey, E. and H. Döhner, *Acute myeloid leukaemia.* The Lancet. **368**(9550): p. 1894-1907.
110. Cornelissen, J.J., et al., *Comparative therapeutic value of post-remission approaches in patients with acute myeloid leukemia aged 40-60 years.* Leukemia, 2015. **29**(5): p. 1041-50.
111. Dombret, H., et al., *International phase 3 study of azacitidine vs conventional care regimens in older patients with newly diagnosed AML with >30% blasts.* Blood, 2015. **126**(3): p. 291-9.
112. Maroc, N., et al., *Biochemical characterization and analysis of the transforming potential of the FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase.* Oncogene, 1993. **8**(4): p. 909-18.
113. Porter, D.L., et al., *Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia.* N Engl J Med, 2011. **365**(8): p. 725-33.
114. Medinger, M., C. Lengerke, and J. Passweg, *Novel therapeutic options in Acute Myeloid Leukemia.* Leuk Res Rep, 2016. **6**: p. 39-49.
115. Rowley, J.D., *Identificaton of a translocation with quinacrine fluorescence in a patient with acute leukemia.* Ann Genet, 1973. **16**(2): p. 109-12.
116. Miyoshi, H., et al., *t(8;21) breakpoints on chromosome 21 in acute myeloid leukemia are clustered within a limited region of a single gene, AML1.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(23): p. 10431-4.

117. Erickson, P., et al., *Identification of breakpoints in t(8;21) acute myelogenous leukemia and isolation of a fusion transcript, AML1/ETO, with similarity to Drosophila segmentation gene, runt*. Blood, 1992. **80**(7): p. 1825-31.
118. Miyoshi, H., et al., *Alternative splicing and genomic structure of the AML1 gene involved in acute myeloid leukemia*. Nucleic Acids Res, 1995. **23**(14): p. 2762-9.
119. Martinez, M., et al., *Transcriptional Auto-Regulation of RUNX1 P1 Promoter*. PLoS One, 2016. **11**(2): p. e0149119.
120. Komeno, Y., et al., *Runx1 exon 6-related alternative splicing isoforms differentially regulate hematopoiesis in mice*. Blood, 2014. **123**(24): p. 3760-9.
121. Wolford, J.K. and M. Prochazka, *Structure and expression of the human MTG8/ETO gene*. Gene, 1998. **212**(1): p. 103-9.
122. Lindberg, S.R., et al., *The Leukemia-associated ETO homologues are differently expressed during hematopoietic differentiation*. Exp Hematol, 2005. **33**(2): p. 189-98.
123. Martens, J.H., et al., *ERG and FLI1 binding sites demarcate targets for aberrant epigenetic regulation by AML1-ETO in acute myeloid leukemia*. Blood, 2012. **120**(19): p. 4038-48.
124. Lam, K. and D.E. Zhang, *RUNX1 and RUNX1-ETO: roles in hematopoiesis and leukemogenesis*. Front Biosci (Landmark Ed), 2012. **17**: p. 1120-39.
125. Zhang, J., et al., *Oligomerization of ETO is obligatory for corepressor interaction*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(1): p. 156-63.
126. Liu, S., et al., *Interplay of RUNX1/MTG8 and DNA methyltransferase 1 in acute myeloid leukemia*. Cancer Res, 2005. **65**(4): p. 1277-84.
127. Ponnusamy, K., et al., *RUNX1/ETO blocks selectin-mediated adhesion via epigenetic silencing of PSGL-1*. Oncogenesis, 2015. **4**: p. e146.
128. Osman, D., et al., *A Drosophila model identifies calpains as modulators of the human leukemogenic fusion protein AML1-ETO*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(29): p. 12043-8.
129. Yeh, J.R., et al., *AML1-ETO reprograms hematopoietic cell fate by downregulating scl expression*. Development, 2008. **135**(2): p. 401-10.
130. Rhoades, K.L., et al., *Analysis of the role of AML1-ETO in leukemogenesis, using an inducible transgenic mouse model*. Blood, 2000. **96**(6): p. 2108-15.
131. Yan, M., et al., *A previously unidentified alternatively spliced isoform of t(8;21) transcript promotes leukemogenesis*. Nat Med, 2006. **12**(8): p. 945-9.
132. Schessl, C., et al., *The AML1-ETO fusion gene and the FLT3 length mutation collaborate in inducing acute leukemia in mice*. J Clin Invest, 2005. **115**(8): p. 2159-68.
133. Yan, M., et al., *Deletion of an AML1-ETO C-terminal NcoR/SMRT-interacting region strongly induces leukemia development*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(49): p. 17186-91.
134. Higuchi, M., et al., *Expression of a conditional AML1-ETO oncogene bypasses embryonic lethality and establishes a murine model of human t(8;21) acute myeloid leukemia*. Cancer Cell, 2002. **1**(1): p. 63-74.
135. Yergeau, D.A., et al., *Embryonic lethality and impairment of haematopoiesis in mice heterozygous for an AML1-ETO fusion gene*. Nat Genet, 1997. **15**(3): p. 303-306.
136. Okuda, T., et al., *Expression of a knocked-in AML1-ETO leukemia gene inhibits the establishment of normal definitive hematopoiesis and directly generates dysplastic hematopoietic progenitors*. Blood, 1998. **91**(9): p. 3134-43.
137. Okumura, A.J., et al., *t(8;21)(q22;q22) Fusion proteins preferentially bind to duplicated AML1/RUNX1 DNA-binding sequences to differentially regulate gene expression*. Blood, 2008. **112**(4): p. 1392-401.
138. Linggi, B., et al., *The t(8;21) fusion protein, AML1 ETO, specifically represses the transcription of the p14(ARF) tumor suppressor in acute myeloid leukemia*. Nat Med, 2002. **8**(7): p. 743-50.
139. Peterson, L.F., M. Yan, and D.E. Zhang, *The p21Waf1 pathway is involved in blocking leukemogenesis by the t(8;21) fusion protein AML1-ETO*. Blood, 2007. **109**(10): p. 4392-8.



140. Sherr, C.J. and J.M. Roberts, *CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression*. Genes Dev, 1999. **13**(12): p. 1501-12.
141. Wang, Z., et al., *Dysregulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21WAF1/CIP1/MDA6 increases the susceptibility of human leukemia cells (U937) to 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine-mediated mitochondrial dysfunction and apoptosis*. Cancer Res, 1999. **59**(6): p. 1259-67.
142. Berg, T., et al., *Transcriptional upregulation of p21/WAF/Cip1 in myeloid leukemic blasts expressing AML1-ETO*. Haematologica, 2008. **93**(11): p. 1728-33.
143. Li, Z., et al., *Distinct microRNA expression profiles in acute myeloid leukemia with common translocations*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008. **105**(40): p. 15535-15540.
144. Fazi, F., et al., *Epigenetic silencing of the myelopoiesis regulator microRNA-223 by the AML1/ETO oncoprotein*. Cancer Cell, 2007. **12**(5): p. 457-66.
145. Ambros, V., *microRNAs: tiny regulators with great potential*. Cell, 2001. **107**(7): p. 823-6.
146. Du, T. and P.D. Zamore, *microPrimer: the biogenesis and function of microRNA*. Development, 2005. **132**(21): p. 4645-52.
147. Griffiths-Jones, S., et al., *miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature*. Nucleic Acids Res, 2006. **34**(Database issue): p. D140-4.
148. Lee, R.C., R.L. Feinbaum, and V. Ambros, *The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14*. Cell, 1993. **75**(5): p. 843-54.
149. Bartel, D.P., *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function*. Cell, 2004. **116**(2): p. 281-97.
150. Yu, J., et al., *Human microRNA clusters: Genomic organization and expression profile in leukemia cell lines*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2006. **349**(1): p. 59-68.
151. Cai, X., C.H. Hagedorn, and B.R. Cullen, *Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs*. RNA, 2004. **10**(12): p. 1957-66.
152. Han, J., et al., *The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing*. Genes Dev, 2004. **18**(24): p. 3016-27.
153. Han, J., et al., *Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex*. Cell, 2006. **125**(5): p. 887-901.
154. Lee, Y., et al., *The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing*. Nature, 2003. **425**(6956): p. 415-9.
155. Bohnsack, M.T., K. Czaplinski, and D. Gorlich, *Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs*. RNA, 2004. **10**(2): p. 185-91.
156. Lund, E., et al., *Nuclear export of microRNA precursors*. Science, 2004. **303**(5654): p. 95-8.
157. Zhang, H., et al., *Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III*. Cell, 2004. **118**(1): p. 57-68.
158. Fukunaga, R., et al., *Dicer partner proteins tune the length of mature miRNAs in flies and mammals*. Cell, 2012. **151**(3): p. 533-46.
159. Hammond, S.M., et al., *Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi*. Science, 2001. **293**(5532): p. 1146-50.
160. Lewis, B.P., et al., *Prediction of mammalian microRNA targets*. Cell, 2003. **115**(7): p. 787-98.
161. Lin, S. and R.I. Gregory, *MicroRNA biogenesis pathways in cancer*. Nat Rev Cancer, 2015. **15**(6): p. 321-33.
162. Ooi, A.G., et al., *MicroRNA-125b expands hematopoietic stem cells and enriches for the lymphoid-balanced and lymphoid-biased subsets*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(50): p. 21505-10.
163. Xu, N., et al., *MicroRNA-125b down-regulates matrix metalloproteinase 13 and inhibits cutaneous squamous cell carcinoma cell proliferation, migration, and invasion*. J Biol Chem, 2012. **287**(35): p. 29899-908.

164. Ge, Y., Y. Sun, and J. Chen, *IGF-II is regulated by microRNA-125b in skeletal myogenesis*. J Cell Biol, 2011. **192**(1): p. 69-81.
165. Yekta, S., I.H. Shih, and D.P. Bartel, *MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA*. Science, 2004. **304**(5670): p. 594-6.
166. Ben-Ami, O., et al., *A regulatory interplay between miR-27a and Runx1 during megakaryopoiesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(1): p. 238-43.
167. Ichimura, A., et al., *MicroRNA-34a inhibits cell proliferation by repressing mitogen-activated protein kinase kinase 1 during megakaryocytic differentiation of K562 cells*. Mol Pharmacol, 2010. **77**(6): p. 1016-24.
168. Lu, J., et al., *MicroRNA-mediated control of cell fate in megakaryocyte-erythrocyte progenitors*. Dev Cell, 2008. **14**(6): p. 843-53.
169. Choong, M.L., H.H. Yang, and I. McNiece, *MicroRNA expression profiling during human cord blood-derived CD34 cell erythropoiesis*. Exp Hematol, 2007. **35**(4): p. 551-64.
170. Calin, G.A., et al., *Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(24): p. 15524-9.
171. Calin, G.A., et al., *Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(9): p. 2999-3004.
172. Melo, S.A., et al., *A TARBP2 mutation in human cancer impairs microRNA processing and DICER1 function*. Nat Genet, 2009. **41**(3): p. 365-70.
173. Melo, S.A., et al., *A genetic defect in exportin-5 traps precursor microRNAs in the nucleus of cancer cells*. Cancer Cell, 2010. **18**(4): p. 303-15.
174. Roman-Gomez, J., et al., *Epigenetic regulation of microRNAs in acute lymphoblastic leukemia*. J Clin Oncol, 2009. **27**(8): p. 1316-22.
175. Cimmino, A., et al., *miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(39): p. 13944-9.
176. Kluiver, J., et al., *BIC and miR-155 are highly expressed in Hodgkin, primary mediastinal and diffuse large B cell lymphomas*. J Pathol, 2005. **207**(2): p. 243-9.
177. O'Donnell, K.A., et al., *c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression*. Nature, 2005. **435**(7043): p. 839-43.
178. Altuvia, Y., et al., *Clustering and conservation patterns of human microRNAs*. Nucleic Acids Research, 2005. **33**(8): p. 2697-2706.
179. Yang, J.S., et al., *Conserved vertebrate mir-451 provides a platform for Dicer-independent, Ago2-mediated microRNA biogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(34): p. 15163-8.
180. Yu, D., et al., *miR-451 protects against erythroid oxidant stress by repressing 14-3-3zeta*. Genes Dev, 2010. **24**(15): p. 1620-33.
181. Rasmussen, K.D., et al., *The miR-144/451 locus is required for erythroid homeostasis*. J Exp Med, 2010. **207**(7): p. 1351-8.
182. Fu, Y.F., et al., *Mir-144 selectively regulates embryonic alpha-hemoglobin synthesis during primitive erythropoiesis*. Blood, 2009. **113**(6): p. 1340-9.
183. Oates, A.C., et al., *The zebrafish klf gene family*. Blood, 2001. **98**(6): p. 1792-801.
184. Su, Z., et al., *Mir-144 regulates hematopoiesis and vascular development by targeting meis1 during zebrafish development*. Int J Biochem Cell Biol, 2014. **49**: p. 53-63.
185. Merkerova, M., M. Belickova, and H. Bruchova, *Differential expression of microRNAs in hematopoietic cell lineages*. Eur J Haematol, 2008. **81**(4): p. 304-10.
186. Zhan, M., et al., *MicroRNA expression dynamics during murine and human erythroid differentiation*. Exp Hematol, 2007. **35**(7): p. 1015-25.
187. Nan, Y., et al., *MIRNA-451 plays a role as tumor suppressor in human glioma cells*. Brain Res, 2010. **1359**: p. 14-21.
188. You, W., et al., *High-Throughput Screening Identifies miR-451 as a Pleiotropic Modulator That Suppresses Gastric Cancer Metastasis*. J Lab Autom, 2016.

189. Liu, S.-Y., et al., *miR-451 inhibits cell growth, migration and angiogenesis in human osteosarcoma via down-regulating IL 6R*. Biochemical and Biophysical Research Communications.
190. Ling, S., et al., *Expression and prognostic significance of microRNA-451 in human epithelial ovarian cancer*. Eur J Gynaecol Oncol, 2015. **36**(4): p. 463-8.
191. Li, H.P., et al., *miR-451 inhibits cell proliferation in human hepatocellular carcinoma through direct suppression of IKK-beta*. Carcinogenesis, 2013. **34**(11): p. 2443-51.
192. Wang, R., et al., *MicroRNA-451 functions as a tumor suppressor in human non-small cell lung cancer by targeting ras-related protein 14 (RAB14)*. Oncogene, 2011. **30**(23): p. 2644-58.
193. Zang, W.Q., et al., *MiR-451 inhibits proliferation of esophageal carcinoma cell line EC9706 by targeting CDKN2D and MAP3K1*. World J Gastroenterol, 2015. **21**(19): p. 5867-76.
194. Mamoori, A., et al., *Expression pattern of miR-451 and its target MIF (macrophage migration inhibitory factor) in colorectal cancer*. J Clin Pathol, 2016.
195. Michael R. Green, J.S., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 4th ed. Vol. 1. 2012, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
196. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.
197. Jaatinen, T. and J. Laine, *Isolation of mononuclear cells from human cord blood by Ficoll-Paque density gradient*. Curr Protoc Stem Cell Biol, 2007. **Chapter 2**: p. Unit 2A.1.
198. Mahajan, M.C., et al., *Dynamics of alpha-globin locus chromatin structure and gene expression during erythroid differentiation of human CD34(+) cells in culture*. Exp Hematol, 2009. **37**(10): p. 1143-1156 e3.
199. Ebert, B.L., et al., *Identification of RPS14 as a 5q- syndrome gene by RNA interference screen*. Nature, 2008. **451**(7176): p. 335-9.
200. Bruchova, H., et al., *Regulated expression of microRNAs in normal and polycythemia vera erythropoiesis*. Exp Hematol, 2007. **35**(11): p. 1657-67.
201. Pase, L., et al., *miR-451 regulates zebrafish erythroid maturation in vivo via its target gata2*. Blood, 2009. **113**(8): p. 1794-804.
202. Navarro, F., et al., *miR-34a contributes to megakaryocytic differentiation of K562 cells independently of p53*. Blood, 2009. **114**(10): p. 2181-92.
203. Yang, G.H., et al., *MicroRNAs are involved in erythroid differentiation control*. J Cell Biochem, 2009. **107**(3): p. 548-56.
204. Opalinska, J.B., et al., *MicroRNA expression in maturing murine megakaryocytes*. Blood, 2010. **116**(23): p. e128-38.
205. Felli, N., et al., *MicroRNAs 221 and 222 inhibit normal erythropoiesis and erythroleukemic cell growth via kit receptor down-modulation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(50): p. 18081-6.
206. Felli, N., et al., *MicroRNA 223-dependent expression of LMO2 regulates normal erythropoiesis*. Haematologica, 2009. **94**(4): p. 479-86.
207. Kuvardina, O.N., et al., *RUNX1 represses the erythroid gene expression program during megakaryocytic differentiation*. Blood, 2015. **125**(23): p. 3570-9.
208. Kohrs, N., et al., *MiR144/451 Expression Is Repressed by RUNX1 During Megakaryopoiesis and Disturbed by RUNX1/ETO*. PLoS Genet, 2016. **12**(3): p. e1005946.
209. Tonks, A., et al., *The AML1-ETO fusion gene promotes extensive self-renewal of human primary erythroid cells*. Blood, 2003. **101**(2): p. 624-32.
210. Choi, Y., et al., *Erythroid inhibition by the leukemic fusion AML1-ETO is associated with impaired acetylation of the major erythroid transcription factor GATA-1*. Cancer Res, 2006. **66**(6): p. 2990-6.
211. Wu, M. and H.B. Shu, *MLL1/WDR5 complex in leukemogenesis and epigenetic regulation*. Chin J Cancer, 2011. **30**(4): p. 240-6.
212. Reis, R.S., *The entangled history of animal and plant microRNAs*. Funct Integr Genomics, 2016.

- 
213. Bruchova-Votavova, H., D. Yoon, and J.T. Prchal, *miR-451 enhances erythroid differentiation in K562 cells*. Leuk Lymphoma, 2010. **51**(4): p. 686-93.
  214. Wadman, I.A., et al., *The LIM-only protein Lmo2 is a bridging molecule assembling an erythroid, DNA-binding complex which includes the TAL1, E47, GATA-1 and Ldb1/NLI proteins*. Embo j, 1997. **16**(11): p. 3145-57.
  215. Guccione, E., et al., *Methylation of histone H3R2 by PRMT6 and H3K4 by an MLL complex are mutually exclusive*. Nature, 2007. **449**(7164): p. 933-7.
  216. Kornacki, J.R., A.D. Stuparu, and M. Mrksich, *Acetyltransferase p300/CBP Associated Factor (PCAF) Regulates Crosstalk-Dependent Acetylation of Histone H3 by Distal Site Recognition*. ACS Chemical Biology, 2015. **10**(1): p. 157-164.
  217. Boyes, J., et al., *Regulation of activity of the transcription factor GATA-1 by acetylation*. Nature, 1998. **396**(6711): p. 594-8.
  218. Huang, S., et al., *p300 functions as a transcriptional coactivator for the TAL1/SCL oncoprotein*. Oncogene, 1999. **18**(35): p. 4958-67.
  219. Herglotz, J., et al., *Histone arginine methylation keeps RUNX1 target genes in an intermediate state*. Oncogene, 2013. **32**(20): p. 2565-75.
  220. Hyllus, D., et al., *PRMT6-mediated methylation of R2 in histone H3 antagonizes H3 K4 trimethylation*. Genes Dev, 2007. **21**(24): p. 3369-80.
  221. Su, R., et al., *c-Myc suppresses miR-451 dash, verticalYWTAZ/AKT axis via recruiting HDAC3 in acute myeloid leukemia*. Oncotarget, 2016.
  222. Brioschi, M., et al., *Down-regulation of microRNAs 222/221 in acute myelogenous leukemia with deranged core-binding factor subunits*. Neoplasia, 2010. **12**(11): p. 866-76.